

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### ÉTUDE SUR LA VACCINATION CHARBONNEUSE,

PAR M. N. GAMALÉIA.

Grâce à l'obligeance de M. Pasteur et de M. Roux, j'ai pu, lors de mon séjour à Paris, étudier au laboratoire de la rue d'Ulm les principes fondamentaux de l'atténuation de la bactériidie charbonneuse, ainsi que les propriétés pathogènes des vaccins qui servent pour la vaccination charbonneuse en France<sup>1</sup>. J'ai poursuivi à Odessa ces études, dont quelques résultats ont déjà été publiés ailleurs<sup>2</sup>.

#### I. — LES VACCINS.

Pour la préparation des vaccins, j'ai adopté la méthode des antiseptiques de MM. Chamberland et Roux<sup>3</sup>. Si l'on ajoute au bouillon de culture une solution stérilisée de bichromate de potasse, de manière à avoir une concentration de 2 à 4 millièmes de cette substance, on aura un développement de la bactériidie

1. La technique de la fabrication des vaccins pour la pratique, telle qu'elle est employée à la rue Vauquelin par M. Chamberland, n'a pas fait l'objet de mes études.

2. *Sur la vaccination charbonneuse. — Sur les vaccins charbonneux.* Février et mai 1888. Journ. de la société d'Économie rurale. Voir aussi : *Sur la destruction des microbes* dans ces *Annales* n° 5, 1888.

3. Comptes rendus, 1883, t. 96, p. 1088 et 1410.

charbonneuse ensemencée, mais ce développement n'aboutira pas à la formation des spores, comme l'ont démontré ces savants.

Ces cultures au bichromate présentent en outre des particularités qui méritent une étude attentive.

L'aspect macroscopique a la forme habituelle, surtout les premiers jours ; on remarque seulement un retard plus ou moins grand, en rapport avec la quantité de bichromate ajouté. L'examen microscopique révèle, au contraire, des formes insolites.

Outre les formes connues, dites involutives, qu'on trouve dans chaque culture charbonneuse, on y décèle les suivantes.

Les plus nombreuses et constantes sont les formes *diminuées* dans toutes leurs dimensions. Le bacille charbonneux devient deux à trois fois plus court, les interstices qui séparent les petits articles d'un filament s'agrandissent ; mais c'est surtout l'épaisseur des bacilles qui s'amoindrit manifestement, et qui peut n'être plus que le tiers de l'épaisseur de la forme virulente semée. Souvent aussi les bouts des bacilles présentent des changements pathologiques : ils ne sont pas coupés à angle droit, mais dentelés ou pointus.

Cet amincissement de la bactériodie virulente dans les cultures au bichromate doit être considéré comme le phénomène morphologique principal, puisque, ainsi que nous allons le voir, il marche de pair avec la qualité physiologique de *l'atténuation*. Il se retrouve dans les cultures en milieux acides, et aussi dans certaines conditions spéciales qui seront exposées plus loin.

Une autre variété qui naît dans le bouillon au bichromate est celle que j'ai décrite sous le nom de *digérée*<sup>1</sup> dans un autre article. Le bacille charbonneux se divise en petits tronçons transversaux qui se gonflent, acquièrent l'aspect de gros coccus, pâlisent, et ne présentent plus à la fin qu'une pâle enveloppe privée de contenu. Ce phénomène, qu'il est facile de reproduire en quelques minutes par le suc gastrique naturel ou artificiel, agissant sur la bactériodie normale, pourrait être appelée *disso-lution*.

Il me reste à décrire encore une forme beaucoup plus rare, c'est la bactériodie à *fourreau*. On trouve parfois dans les cultures chaque bactériodie entourée par une large enveloppe qui dépasse

1. Ce recueil, n° 5, 1888.



deux ou trois fois la largeur du bacille normal, et qui se colore fortement par des couleurs d'aniline, ne laissant que rarement apercevoir le bacille situé à l'intérieur <sup>1</sup>.

On saisit l'importance de toutes ces modifications subies par les cultures charbonneuses au bichromate, quand on ensemence avec elles un bouillon normal. Alors on trouve, avec les auteurs de la méthode, que toutes ces nouvelles cultures sont plus ou moins *atténuées*. Quant à leur aspect macroscopique, quand elles sont faites à 35°, on trouve souvent non seulement que les flocons typiques du charbon sont plus ténus et fragiles, mais on remarque aussi dans les cultures les plus atténuées l'absence complète de flocons au fond du vase; le trouble du bouillon est presque uniforme. Au contraire, à la température ordinaire, le développement est lent, mais toujours en flocons nageant dans un bouillon limpide. L'examen microscopique continue à donner des détails intéressants. Les formes à *fourreaux* et *dissoutes* ne se rencontrent plus dans les cultures fraîches, mais ce sont les formes amoindries qui se développent. Outre leurs dimensions, les baguettes du charbon atténué se distinguent de la bactériodie virulente par leurs bouts souvent arrondis. Quant à la grandeur de ces bacilles, il est incontestable que leur *diminution marche tout à fait parallèlement avec l'atténuation* de la virulence. Si on prend la précaution de ne comparer entre elles que les cultures fraîches et non en involution, on pourra facilement se convaincre que plus une culture est atténuée, plus sont petits les bacilles qui la composent.

Entre toutes ces cultures atténuées, nous en avons choisi deux, le premier et le deuxième vaccin, pour la vaccination des moutons.

Notre premier vaccin a les propriétés suivantes : ce sont de petits bacilles ayant souvent des bouts arrondis. Les premières cultures, issues du bouillon bichromaté, ne poussent que mé-

1. Ces enveloppes ne doivent pas être confondues avec les capsules transparentes qui se forment parfois autour de la bactériodie virulente, comme M. Metchnikoff l'a vu dans le sang des lézards, et comme nous l'avons observé dans un cas de charbon intestinal chez un mouton. Ces capsules sont constantes dans les cultures charbonneuses faites dans le lait. Nos enveloppes ou fourreaux correspondent plutôt à celles que Metchnikoff a décrites pour les bacilles tuberculeux. Voir *Virchow's Archiv*, 1888, et ces *Annales*, tome II, p. 505.

diocrement sur la gélose et ont une tendance à produire dans le bouillon de culture, le deuxième et le troisième jour, des formes involutives, et les pseudospores dites microspores et arthros pores.

Les formes involutives sont tout à fait semblables à celles qui sont décrites pour la bactériidie virulente par beaucoup d'auteurs; elles sont contournées en hélice et diversement élargies. Les microspores sont de petits grains brillants qui se forment à l'intérieur d'une baguette et n'occupent pas toute sa largeur. Les arthros pores sont tout un tronçon du bacille, qui acquiert la réfringence brillante sans changer sa forme prismatique. Les arthros pores et microspores ne retiennent pas la double coloration. Les endospores typiques ne se forment pas dans ces conditions.

Après avoir fait quelques passages (10 à 15) par le corps des souris, j'ai vu un grand changement survenir dans mon premier vaccin. Il a commencé à se cultiver abondamment sur la gélose, en y produisant de véritables endospores au bout de deux jours. C'est de ce vaccin *fortifié* ou *rafraîchi* que nous allons décrire les principales propriétés morphologiques et physiologiques.

Notre premier vaccin, inoculé en quantité de  $1/8^{\text{cc}}$ . sous la peau du mouton, détermine chez lui une fièvre vaccinale d'un ou de deux jours de durée. Inoculé dans la chambre antérieure de l'œil, il lui donne une fièvre intense (jusqu'à  $42^{\circ}$ ) pendant 4 et 5 jours.

Le premier vaccin tue, en quantité de  $1/8^{\text{cc}}$ , la souris grise en 30 à 40 heures, la souris blanche en 48 à 60 heures. En quantité plus forte il tue aussi les cobayes, tandis que les lapins lui sont absolument réfractaires : l'inoculation de 50 à  $100^{\text{cc}}$  d'une culture dans du bouillon ne leur donne que la fièvre vaccinale allant jusqu'à  $41^{\circ} 5'$ .

Le deuxième vaccin contient des bacilles manifestement plus grands que ceux du premier, quoique plus petits que la bactérie virulente. Les endospores se forment sur la gélose au bout de 30 à 40 heures.

Le deuxième vaccin tue plus de 50 0/0 des moutons frais inoculés par  $1/8^{\text{cc}}$ . sous la peau. Chez les moutons déjà inoculés par le premier vaccin, le deuxième produit une forte fièvre vaccinale de  $41^{\circ} 5' - 42^{\circ}$ .

1. Voir ces *Annales*, t. II, n° 5.



Le deuxième vaccin tue tous les animaux qui succombent au premier vaccin, et outre cela les lapins et les rats blancs.

Inoculé sous la peau du lapin en quantité de  $1/8^{\text{cc}}$ , il le tue en 48 ou 60 heures. Le rat blanc ne succombe qu'à l'inoculation de un centimètre cube.

Ces propriétés physiologiques des vaccins se rapportent à des cultures fraîches de deux jours dans le bouillon. Les vieilles cultures, surtout celles qui ont été faites dans la gélatine nutritive, ont leur virulence considérablement atténuée.

Pour la conserver, nous avons adopté la méthode suivante. On fait avec des germes, formés sur la gélose, et du bouillon stérilisé, une émulsion dense dont on imbibe de petits fils de soie, qui sont ensuite séchés et mis à la cave.

Cette méthode indiquée par M. Kitt<sup>1</sup> nous a donné de bons résultats, en ce sens que la virulence des vaccins n'a pas sensiblement changé pendant six mois.

Pour ramener les vaccins affaiblis à leur virulence normale, nous employons la méthode indiquée par MM. Pasteur, Chamberland et Roux<sup>2</sup>.

Revenant maintenant à la comparaison entre ces deux vaccins et le virus charbonneux, nous trouvons que les bactériidies atténuées se distinguent de la bactériodie virulente par un nombre considérable de caractères morphologiques et physiologiques.

Le plus important parmi les premiers est la diminution de grandeur. En faisant des *mensurations* exactes, nous avons pu constater que le premier vaccin est deux fois plus mince que la bactériodie virulente (dans des cultures faites dans les mêmes conditions dans le bouillon). Le deuxième vaccin occupe une place intermédiaire, il a en moyenne les  $3/4$  de la largeur du bacille normal virulent. Il était encore intéressant de rechercher si on ne pourrait pas réussir à trouver des différences spécifiques dans les cultures comparatives de ces trois formes. En comparant les cultures fraîches, faites avec des semences récemment issues du corps de l'animal, nous n'avons pas remarqué ces différences dans la vitesse

1. TH. KITT, *Werth und Unwerth der Schutzimpfungen gegen Thierseuchen*, 1886, p. 105.

2. PASTEUR, CHAMBERLAND ET ROUX, De l'atténuation des virus et de leur retour à la virulence. *Comptes rendus*, 1881, p. 429.



du développement qui ont été indiquées par M. Smirnoff<sup>1</sup>.

En revanche, les cultures dans le lait stérilisé nous ont donné des différences marquées. Toutes les formes, les deux vaccins et le virus, se développent très bien dans le lait. Comme particularité intéressante de ces cultures, il faut noter les capsules transparentes autour des bacilles. Ces capsules existent autour de la bactériodie du premier vaccin aussi bien qu'autour de la virulente, ce qui exclut leur connexité avec la virulence : elles sont peut-être en relation avec une formation d'acide lactique, qui pourrait décolorer le fond des lamelles colorées par le bleu de méthylène.

La culture virulente coagule le lait vers le 3<sup>e</sup> jour à 35°. La caséine coagulée se rassemble lentement au fond des matras de culture, mais n'y reste pas longtemps : au bout de 7 à 10 jours elle est de nouveau complètement dissoute. On a alors deux couches seulement dans les cultures : la crème surnage un liquide jaune. Les vaccins ne coagulent pas du tout le lait. A peine si au bout de 10 à 15 jours on remarque dans les cultures du deuxième vaccin une mince couche plus transparente au-dessous de la crème. Les cultures du premier vaccin ne changent nullement l'aspect du lait pendant les deux premières semaines, après quoi elles dissolvent lentement la caséine sans la précipiter. Quant à l'explication de ces différences, nous croyons pouvoir la trouver dans la susceptibilité diverse du virus et des vaccins par rapport à l'action de l'acide lactique. La réaction est manifestement acide dans les trois cultures, mais elle est plus prononcée avec la bactériodie virulente qui est aussi celle qui donne les cultures les plus abondantes. Il est clair dès lors que le développement et, par conséquent, l'acidité croissante des cultures est arrêtée dans les cultures vaccinales par l'acide déjà formé. En d'autres termes, les vaccins sont plus sensibles que la caséine à l'égard de l'acide.

Si nous nous sommes autant arrêtés sur la question des différences entre le charbon virulent et le charbon vaccinal, c'est pour les motifs suivants. Premièrement, nous avons montré, entre les trois formes que nous avons étudiées, des différences tout aussi grandes que celles, par exemple, qui ser-

1. SMIRNOFF, Sur la nature de l'atténuation des bactéries pathogènes. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. IV, p. 231.



vent à distinguer les espèces vibrionniennes du *choléra*, de Koch, de Denecke et de Prior et Finkler. Ceci peut rendre plus circospect dans la création de nouvelles espèces fondées sur des caractères aussi fugitifs que la lenteur de développement, la modification de l'aspect du lait, etc.

Deuxièmement, cet arrêt dans le développement des vaccins dans le lait pourra peut-être nous servir à comprendre le rôle des vaccins dans le corps de l'animal<sup>1</sup>.

## II. — FIÈVRE VACCINALE.

Dans la célèbre expérience de Pouilly-le-Fort, aucun changement n'a été remarqué dans l'état de santé des moutons après leur inoculation par les vaccins. Pourtant on peut lire dans les tableaux de température, contenus dans le rapport de M. Rossignol, que plusieurs moutons ont eu une élévation de température, surtout très prononcée (de 2 degrés au maximum) après le deuxième vaccin. D'un autre côté, il faut remarquer que la vaccination à Pouilly-le-Fort n'était pas faite au maximum, c'est-à-dire de façon à empêcher tout développement du virus dans le corps des vaccinés : au contraire, après l'inoculation virulente, plusieurs moutons ont eu la fièvre, des nodosités à l'endroit de l'inoculation ; une brebis est morte du charbon.

Dans le rapport de M. Muller<sup>2</sup> sur les expériences faites par Thuillier en Allemagne, il est noté que le deuxième vaccin produit une affection violente quoique rarement dangereuse, et surtout une forte élévation de la température. Au congrès de Genève, M. Sormanni<sup>3</sup> a raconté que dans l'expérience malheureuse de Bologne, où sur six brebis vaccinées quatre sont mortes dans l'expérience de contrôle, les deux brebis qui ont survécu ont eu une forte fièvre (au delà de 41°) après les vaccins. Et M. Sormanni, s'appuyant sur l'opinion de M. Pasteur, conclut que la manifestation fébrile vaccinale est indispensable à la réussite des vaccinations. Les autres expérimentateurs comme Koch, Gaffky et Loeffler, Kitt, etc., n'ont enregistré

1. Nos vaccins ont été approuvés pour la pratique par une commission spéciale, nommée par la Société impériale d'agriculture de la Russie Nouvelle. La pratique de la vaccination charbonneuse est entièrement confiée à l'Institut d'Odessa à M. Bardach.

2. Cité par Bäumlér : *Der derzeitige Standpunkt der Schutzimpfungen*, 1887.

3. Quatrième congrès, etc., t. I., p. 146.

aucun symptôme appréciable, ni général ni local, de l'influence des vaccins sur les moutons vaccinés. Du reste, la plupart des auteurs n'ont pas fait de mesures de température.

Nous avons pris, au contraire, très régulièrement, au moins deux fois par jour, la température chez tous les moutons que nous avons vaccinés<sup>1</sup>.

Ces recherches ont conduit à un résultat très net.

Tous les moutons qui subissent par suite de la vaccination une élévation considérable de température acquièrent une immunité complète vis-à-vis de l'infection sous-cutanée virulente, qui ne produit alors aucun symptôme fébrile.

Tous ceux qui n'ont pas la fièvre vaccinale n'acquièrent pas l'état réfractaire, non seulement par rapport au virus, mais même vis-à-vis des vaccins, qui peuvent être réinoculés et donner la fièvre.

Vu la grande portée de ces résultats, je me permets de donner en détail quelques températures.

Dans les tableaux qui suivent, on trouve, en regard de chaque vaccination, sa date, et pour chacun des jours qui ont suivi, le relevé des températures. Pour simplifier, on a supposé le zéro commun à 38°, la plus basse température observée. Les observations du matin et du soir sont, quand il y a lieu, inscrites l'une à la suite de l'autre et séparées par un tiret. Les températures matinales du premier jour sont toujours celles qui ont précédé le moment de la vaccination.

	1 <sup>er</sup> VACCIN.	2 <sup>e</sup> VACCIN.	VIRUS. <sup>2</sup>	OBSERVATIONS.
1 <sup>re</sup> EXPÉRIENCE.	12 juillet	11 août	31 août	
1	1,8 — 1,8	1,9 — 2,9	1,4 — 1,4	Aucun symptôme morbide.
2	1,8 — 2,6	3,0 — 2,9	0,9 — 0,9	
3	2,2 — 2,1	3,2 — 2,9	1,2 — 1,5	
4	1,9 — 1,9	2,2 — 2,4	1,3 — 1,4	
2 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	20 sept.	14 oct.	30 oct.	
1	1,5 — 1,5	2,0 — 2,6	0,8 — 0,8	Id.
2	2,3 — 2,5	2,2 — 2,7	1,2 — 1,0	
3	3,0 — 2,9	3,1 — 2,5	1,0 — 1,1	
4	1,5 — 1,7	1,9 — 2,0	1,3 — 1,5	

1. La plupart de nos expériences, sur plus de 300 moutons, ont été faites en 1887.

2. Ce virus a toujours été inoculé à la fois aux moutons vaccinés, et à un ou deux moutons non vaccinés qui ont toujours succombé au charbon.



# ÉTUDE SUR LA VACCINATION CHARBONNEUSE. 523

	1 <sup>er</sup> VACCIN.	2 <sup>e</sup> VACCIN.	VIRUS.	OBSERVATIONS.
3 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	20 sept.	14 oct.	30 oct.	
1	1,5 — 1,5	2,2 — 2,6	0,7 — 0,7	Aucun symptôme morbide.
2	2,3 — 2,5	2,9 — 3,4	1,1 — 1,2	
3	3,0 — 2,9	2,9 — 3,8		
4	1,5 — 1,7	1,5		
4 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	12 juillet	10 août	31 août	
1	1,8 — 1,9	1,3 — 2,6	2,0 — 2,0	Id.
2	2,1 — 2,8	3,8 — 3,1	2,0 — 2,1	
3	3,1 — 2,8	2,3 — 2,0	1,9 — 1,9	
4	2,7 — 2,3	2,0 — 1,8	1,7 — 1,9	
5	1,9 — 2,1	1,6 — 1,8	1,7 — 1,9	
5 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	12 juillet	10 août	31 août	
1	2,0 — 2,2	2,2 — 2,8	1,6 — 1,6	Id.
2	1,6 — 2,2	2,2 — 1,0	1,4 — 1,7	
3	1,7 — 2,0	1,4 — 2,0	1,5 — 1,4	
4	2,2 — 2,2	3,4 — 2,5	1,6 — 1,8	
5	3,0 — 2,8	2,2 — 2,3	1,5 — 1,7	
6	1,3 — 1,4	1,5 — 1,7	1,5 — 1,7	
6 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	12 juillet	10 août	31 août	
1		2,0 — 2,2	1,5 — 1,5	Mort du charbon.
2		1,9 — 1,7	1,5 — 1,8	
3		1,4 — 1,6	1,3 — 1,5	
4		1,5 — 1,6	1,2 — 2,0	
5		1,5 — 1,7	1,2 — 1,9	
6		1,6 — 1,8	1,7 — 1,9	
7		1,7 — 1,7	1,5 — 3,0	
7 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.		10 août	31 août	
1		2,0 — 2,9	1,5 — 1,2	Aucun symptôme morbide.
2		3,0 — 2,9	0,9 — 0,9	
3		3,2 — 2,9	1,2 — 1,5	
4		2,2 — 2,8	1,3 — 1,4	
8 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.		10 août	31 août	
1		1,3 — 1,4	1,9 — 2,0	Id.
2		3,8 — 3,3	2,0 — 2,3	
3		2,3 — 2,1	1,9 — 1,9	
4		2,0 — 1,9	1,6 — 1,8	

	1 <sup>er</sup> VACCIN.	2 <sup>e</sup> VACCIN.	VIRUS.	OBSERVATIONS.
9 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.		14 oct.	30 oct.	
1		1,8 — 2,4	0,0 — 0,0	Mort du charbon.
2		1,7 — 2,0	0,9 — 1,3	
3		1,3	1,9 — 1,7	
4		1,8	1,7 — 2,0	
5		1,7	2,0 — 3,3	
6		1,8	3,4 — 3,4	
7			3,2 — 3,9	
8			3,8	
10 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	12 juillet	14 oct.	30 oct.	
1	1,5 — 1,5	2,0 — 2,6	0,8 — 0,8	Aucun symptôme morbide.
2	2,3 — 2,5	2,2 — 2,7	1,2 — 1,0	
3	3,0 — 2,9	3,1 — 2,5	1,0 — 1,1	
4	1,5 — 1,7	2,0 — 2,2	1,3 — 1,5	
11 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.		10 juillet	31 oct.	
1		1,5 — 1,5	1,5 — 1,5	Mort du charbon.
2		1,4 — 1,4	1,9 — 1,3	
3		1,5 — 1,1	1,5 — 1,2	
4		1,0 — 1,6	2,0 — 1,8	
5		1,5 — 1,5	1,8 — 1,7	
6			1,9 — 1,5	
12 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	9 déc.	25 déc.	8 janvier 1888.	
1	1,6	1,1	1,5	Aucun symptôme morbide.
2	1,8	1,5	2,1 — 1,4	
3	2,1	3,8	1,5 — 1,8	
4	2,3	1,8	1,8 — 1,4	
5	1,5	1,0	1,3 — 1,3	
13 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	9 déc.	25 déc.	8 janvier	
1	1,9	1,1	1,9	Id.
2	1,7	3,3	1,4 — 1,4	
3	3,7	1,8	1,5 — 1,5	
4	1,5	1,9	1,3 — 1,3	
5	1,0	1,5	1,5 — 1,4	
6			1,5	
14 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.				
1	1,4	1,9	1,9	Id.
2	1,3	2,2	1,6 — 1,8	
3	3,7	3,5	1,6	
4	1,6	2,2	1,3 — 1,6	
5	0,7	1,1	1,7 — 1,8	
6			1,3 — 1,6	



15 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	1 <sup>er</sup> VACCIN. 9 déc.	2 <sup>e</sup> VACCIN. 25 déc.	VIRUS. 8 janvier	OBSERVATIONS.
1	1,5	1,9	1,9-	Aucun symptôme morbide.
2	2,3	3,3	1,7 — 1,8	
3	1,6	2,4	1,6 — 1,6	
4	2,8	1,7	1,4 — 1,5	
5	1,1	1,5	1,6 — 1,4	
6			1,4	

16 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.				
1	0,9	1,2	1,8	Id.
2	1,7	2,8	1,5 — 1,6	
3	3,5	1,6	1,7 — 1,6	
4	1,6	1,2	1,6 — 1,0	
5	1,1	0,9	1,6 — 1,3	
6			1,5	

De ces expériences, on peut conclure que *l'immunité charbonneuse n'est acquise qu'à la suite d'une fièvre vaccinale.*

Cette proposition, fondamentale pour toute la vaccination, peut être confirmée par d'autres faits.

On peut, par exemple, vacciner les moutons avec un seul vaccin, mais celui-ci doit alors provoquer une fièvre très intense, dangereuse pour la vie de l'animal.

17 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE,	17 avril	1 <sup>er</sup> mai	15 mai	
1	1,4 — 1,2	1,8	1,4	Aucun symptôme morbide après le 2 <sup>e</sup> vaccin et le virus.
2	1,8 — 1,5	1,6	1,2	
3	2,2 — 1,9	1,7	1,7	
4	1,6 — 2,2	1,4	1,7	
5	1,9 — 1,9	1,3	1,9	
6	2,9 — 3,3	1,2	1,9	
7	3,7 — 3,7			
8	3,4 — 3,4			
9	3,0 — 3,2			
10	3,3 — 2,6			
11	2,6 — 2,6			

18 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.				
1	2,3 — 1,5	1,4	1,6	Id.
2	1,6 — 2,1	1,7	1,8	
3	2,2 — 1,9	1,9	1,8	
4	2,1 — 2,5	1,2	1,8	
5	2,4 — 2,2	1,9	1,9	
6	3,4 — 3,2	1,5		
7	3,4 — 3,2			
8	2,6 — 2,8			
9	2,4 — 2,4			
10	2,3			

	1 <sup>er</sup> VACCIN.	2 <sup>e</sup> VACCIN.	VIRUS.	OBSERVATIONS.
19 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.				
1	2,2 — 1,8	2,4	1,8	Aucun symptôme morbide après le 2 <sup>e</sup> vaccin et le virus.
2	2,0 — 2,0	2,7	2,2	
3	2,6 — 2,2	2,1	»	
4	1,7 — 2,4	2,5	2,0	
5	1,7 — 2,5	2,3	2,0	
6	3,6 — 3,7	1,8	1,9	
7	3,6 — 3,8			
8	3,0 — 3,5			
9	3,3 — 3,0			
10	3,0 — 2,7			
11	1,6 — 2,4			

Au contraire, si le premier vaccin ne provoque pas de fièvre, le second en donne une très intense. Exemples :

20 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.	21 avril	3 mai	13 mai
1	1,8 — 1,8	1,4	2,2
2	1,9 — 1,9	1,8 — 1,7	0,6
3	1,7 — 1,7	3,2 — 4,0	»
4	1,5 — 1,4	4,1 — 3,6	2,2
5	1,0 — 2,0	2,9	1,9
6	1,6 — 1,0	1,4	2,1
7	1,8 — 1,7		0,9
8	2,1		1,5
9	1,7		
10	1,5		
11	2,1		

21 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.			
1	2,0 — 2,1	1,9 — 2,3	1,5 — 1,9
2	1,8 — 2,0	3,3 — 2,3	1,5
3	2,3 — 1,9	3,2 — 4,0	1,9
4	1,7 — 2,1	3,3 — 2,3	»
5	1,7 — 2,2	3,2 — 2,1	»
6	1,6 — 1,8	2,3 — 2,1	1,7
7	2,0 — 2,0		
8	1,3		
9	2,3		
10	2,0		
11	2,2		

22 <sup>e</sup> EXPÉRIENCE.			
1	1,9 — 2,2	1,7 — 2,0	1,7
2	1,7 — 1,8	2,2 — 2,3	1,7 — 1,9
3	1,5 — 1,8	3,3 — 3,0	2,0
4	1,6 — 2,2	3,4 — 3,4	2,0
5	1,6 — 2,4	1,4 — 3,1	2,0
6	1,8 — 1,7	2,6 — 2,5	2,2
7	1,4 — 1,9		
8	1,7		
9	1,8		
10	1,8		
11	3,2		



Ainsi, il est évident que ce ne sont pas les vaccins, mais la fièvre qu'ils produisent, qui confère l'immunité. Quand la vaccination passe sans réaction fébrile, l'immunité n'est pas acquise.

La meilleure preuve de la valeur de ce principe est son application à de nouveaux faits. Nous en allons citer une.

Il est connu que le vaccin des moutons ne peut pas servir, employé d'après le mode ordinaire, à vacciner les lapins.

En effet, plusieurs expériences m'ont montré que l'inoculation sous-cutanée des lapins par le premier vaccin ne provoque aucune réaction fébrile, tandis que le deuxième vaccin les tue.

D'un autre côté j'ai montré (v. ces *Annales*, mai 1888) qu'en injectant, d'après la nouvelle méthode de MM. Roux et Chamberland, 50<sup>cc</sup> du premier vaccin dans le sang des lapins, on détermine une fièvre vaccinale. Elle est courte, mais elle est répétée deux fois et n'a besoin de vacciner que contre le deuxième vaccin.

Voici un exemple :

Le 29 décembre, un lapin noir est inoculé par 50<sup>cc</sup> du premier vaccin dans la veine de l'oreille.

29 décembre	11 h. 1/2 m.	39°	30 décembre	2 h. m.	40°,3
	2 h. 1/2 s.	40°,2		7 h.	40
	4 h.	41°,3		10 h.	39,5
	5 h.	39°,8		5 h. s.	39,5
	9 h.	39°,7			
	11 h.	40°,4			
	minuit	40°,6			

Ainsi, nous croyons avoir prouvé que la fièvre vaccinale charbonneuse est une condition nécessaire et suffisante pour l'acquisition de l'immunité.

Du reste, ce principe paraît s'appliquer à d'autres vaccinations préventives : ainsi, nous l'avons retrouvé pour le choléra des poules<sup>1</sup>.

On comprend aisément l'importance pratique de ce principe. C'est lui qui détermine le choix entre les virus atténués : on prendra pour premier vaccin celui qui donne une fièvre vaccinale prononcée; pour le deuxième, on choisira celui qui détermine une deuxième fièvre après le premier vaccin.

C'est ainsi que le principe de la fièvre vaccinale donne la

1. Voir *Centralblatt für Bacteriologie*, t. IV, 1888, et ces *Annales*, t. II, p. 510.

meilleure mesure de la force nécessaire du vaccin, et celle-ci une fois trouvée, on la contrôle par une expérience sur les petits animaux, plus fréquents dans les laboratoires.

L'application de ce principe à d'autres maladies pourra facilement faire trouver des vaccins nécessaires et suffisants pour vacciner contre ces maladies.

### III. — MÉCANISME DE L'ACQUISITION DE L'IMMUNITÉ.

#### *a. — Phénomènes de l'économie générale.*

Pour essayer de saisir le mécanisme de la production de la fièvre vaccinale, nous avons étudié directement l'économie des moutons pendant cette fièvre. Dans ce but, nous avons sacrifié les moutons à des périodes diverses de la vaccination.

Cette étude est délicate, parce que, en tuant un mouton, on se prive de la possibilité de contrôler plus tard son immunité charbonneuse acquise; et que, d'un autre côté, on ne peut affirmer qu'il ne serait pas mort par l'effet de la vaccination. Pour éviter ces incertitudes, on était obligé de vacciner à la fois un grand nombre de moutons, dont on sacrifiait quelques-uns pour l'étude de l'acquisition de l'immunité, et dont la majorité restait pour le contrôle de l'innocuité de la fièvre<sup>1</sup> et de la solidité de l'état réfractaire conféré<sup>2</sup>. L'étude des organes des moutons sacrifiés était toujours entreprise immédiatement après leur mort<sup>3</sup>.

Cette étude était conduite d'après les trois méthodes ordinaires : examen microscopique, cultures sur milieux solides,

1. Sur plus de 300 moutons, pas un seul n'a succombé à la vaccination.

2. Ces précautions ont échappé à M. Bitter, qui a répété avec des résultats négatifs nos expériences sur la vaccination charbonneuse. (V. BITTER, Ueber die Verbreitung de Vaccins, etc. *Zeitschrift f. Hygiene*, 4 Bd., 1888.) Il a évidemment sacrifié les moutons en dehors de la fièvre vaccinale. Il n'a pas même fourni la preuve que les vaccins entre ses mains étaient aptes à donner aux moutons une immunité complète, et que celle-ci n'était pas plutôt conférée par la première inoculation virulente.

3. Ce qui est très important, car nous avons constaté par des recherches directes que les formes de destruction des bactéries sont beaucoup moins nombreuses, 6 et 22 heures après la mort, et parce que, d'un autre côté, les bactéries se multiplient dans le cadavre.



(nous avons employé d'ordinaire la gélose, qui est très propice au développement des vaccins), et infection des animaux.

*Premier groupe. — Premier vaccin chez les moutons.*

EXPÉRIENCE I. — Le 12 juillet, le premier vaccin est inoculé à dix moutons. Les températures de l'un d'eux sont les suivantes : Le 12, 39°,5 — 40°,5; le 13, 40°,2 — 39°,8 — 40°,2; le 14, 39°,6 — 40°,7; le 15, 40°,2; on le sacrifie à 8 heures du soir.

A l'autopsie, on trouve : pas de changements macroscopiques à l'endroit de l'inoculation; glande inguinale de l'aine droite hyperplasiée; rate et reins hypérémiés. Une souris blanche inoculée avec la rate reste vivante.

L'examen microscopique donna les résultats suivants :

La glande de l'aine droite était remplie de baguettes fines et courbées avec des bouts arrondis. Les formes de bactériidies dissoutes, gonflées, et se brisant en morceaux quadrangulaires, se rencontrent aussi, mais plus rares. Les poumons, la rate, les glandes mésentériques, le foie et surtout les reins contiennent de grandes quantités de bactéries déformées.

EXPÉRIENCE II. — Le 1<sup>er</sup> octobre, quatre moutons sont inoculés avec le premier vaccin. L'un d'eux, le lendemain, à 8 heures du matin, a une température de 41°,4. Il est tué par le chloroforme, comme tous les autres. Les organes intérieurs sont normaux. Dans le sang du cœur se retrouvent des bactéries intactes du premier vaccin qui ont cultivé sur la gélose. Une souris grise, pourtant, inoculée par le sang du cœur, est restée vivante.

EXPÉRIENCE III. — Le 30 octobre, quatre moutons sont inoculés par le vaccin. L'un d'eux est tué le 1<sup>er</sup> novembre avec une température de 41°,3. Pas d'œdème à l'endroit de l'inoculation. Les organes intérieurs sont normaux. Le sang du cœur ne révèle rien au microscope. Dans la rate, on trouva des bactériidies déformées en petites quantités; dans le foie leur nombre était plus considérable; dans les reins, très grande quantité de formes détruites avec quelques bactériidies normales; dans les poumons, on trouva aussi des bactériidies normales. Les reins, semés sur la gélose, ont donné une culture, tandis que la rate et le foie n'ont rien donné.

Dans la rate de ce mouton, on a semé une culture virulente du charbon, qui a poussé; inoculée ensuite à un lapin, cette culture a donné l'infection charbonneuse mortelle.

EXPÉRIENCE IV. — Le 22 novembre, le premier vaccin est inoculé à trois moutons; le 24, l'un d'eux, qui avait le matin 39°,5 et à 3 heures 40°,7, est sacrifié à ce dernier moment.

A l'endroit de l'inoculation, hyperémie et empatement; les glandes de l'aine droite sont hyperplasiées; la rate et les reins hypérémiés. Dans la rate, on ne trouva que peu de bactériidies déformées dans les macrophages ainsi qu'en dehors d'eux. Dans le sang il n'y avait rien. Le foie contenait

beaucoup plus de bactériidies, déformées en coccus, tandis que les reins les contenaient en quantité énorme. On les trouva aussi dans les capillaires de l'intestin et dans les glandes de l'aine. Les cultures n'ont pas poussé.

*Deuxième groupe<sup>1</sup>. — Deuxième vaccin chez les moutons.*

EXPÉRIENCE I. — Un mouton, déjà vacciné avec le premier vaccin, le 12 juillet, est inoculé le 6 août avec le second. Les relevés de température donnent : le 6, 39°,3 — 39°,1; le 7, 39° — 40°; le 8, 41° — 40°,5 — 40°,1.

On le tue le 8 au soir : les formes dissoutes se trouvent principalement dans les reins; le foie les contient en quantité moindre. On ne trouve rien dans la rate.

EXPÉRIENCE II. — Le 7 octobre, un mouton est vacciné par le deuxième vaccin. Température : le 7, 39°,2 — 39°,9; le 8, 40°,3 — 39°,5; le 9, 41°,8; on le tue.

Hyperplasie des glandes lymphatiques à l'endroit de l'inoculation. Hypérémie de la rate. Dans le sang du cœur, les poumons, la rate, le foie et surtout dans les reins, on trouve des bactéries saines du deuxième vaccin avec leurs formes détruites; avec tous ces organes on a obtenu des cultures sur la gélose.

EXPÉRIENCE III. — Le 10 octobre, un mouton est inoculé par le deuxième vaccin. Température : Le 10, 39°,5 — 40°,1; le 11, 40°,4 — 41°,1; on le tue.

Glandes lymphatiques hyperplasiées; rate tuméfiée et molle; reins hyperémiés. Dans le sang du cœur on trouve des bactériidies typiques. Dans la rate, le foie et les reins : formes de destruction.

EXPÉRIENCE IV. — Le 10 octobre, un mouton est inoculé par le deuxième vaccin. Il a eu une fièvre typique le lendemain. Le 12 octobre, la fièvre tombée, il est mis à mort. Reins et rate hyperémiés. Dans tous les organes, mais principalement le foie et les reins, on trouva de grandes quantités de bactériidies charbonneuses détruites. Tous lesensemencements dans les milieux nutritifs restent stériles.

EXPÉRIENCE V. — Le 14 octobre, vingt moutons sont vaccinés par le deuxième vaccin. La température de l'un d'eux est, le 14, de 38°,9 — 39°,9; le 15, à 7 h. du matin, il a 41°,1 et à 9 h. 41°, 2; on le tue à ce moment.

Les glandes lymphatiques sont hyperplasiées à l'aine gauche. La rate et la couche corticale des reins sont hyperémiés. Les reins et les poumons présentent une masse de bactériidies charbonneuses détruites, parmi lesquelles on trouve parfois des baguettes à l'apparence normale. Les autres organes en contiennent beaucoup moins. Lesensemencements sont restés stériles. Une souris, inoculée par l'émulsion des poumons, est restée vivante.

1. Tous les moutons de ce groupe ont reçu le deuxième vaccin après avoir été vaccinés par le premier. Chacun d'eux avait plusieurs (jusqu'à 20) moutons témoins servant à contrôler l'innocuité de la fièvre et la solidité de l'immunité conférée.



EXPÉRIENCE VI. — Le 14 octobre, un mouton est vacciné par le deuxième vaccin. Sa température est, le 14, de 39°,5 — 40°,3; le 15, il a 39°,6 à 7 h. du matin et 40°,9 à 9 h. du matin; on le tue à ce moment.

Induration à l'endroit de l'inoculation. Reins très hyperémiés. Les bactériidies intactes se trouvent en grande quantité dans les poumons (dans les macrophages), tandis que les reins les contiennent en formes détruites.

EXPÉRIENCE VII. — Un troisième mouton, inoculé le 14 octobre, est tué le lendemain. Température : le 14, 39°,5 — 40°,5; le 15, 40° — 40°,3 — 40°,9; il est tué.

A l'endroit de l'inoculation, hyperémie du tissu conjonctif. La rate est molle. Tous les organes, mais surtout les reins, contiennent une grande quantité de formes détruites; les bactériidies saines sont rares. Une émulsion du poumon est inoculée à une souris grise, qui est restée vivante.

EXPÉRIENCE VIII. — Un mouton, inoculé par le deuxième vaccin, le 14 octobre, est tué le 15, sa température dépassant 40°. Oedème circonscrit à l'endroit de l'inoculation; reins et rate très hyperémiés. Dans tous les organes se trouvent les bactériidies charbonneuses en voie de destruction. Les reins surtout en sont pleins.

EXPÉRIENCE IX. — Le 14 octobre, un mouton est inoculé par le deuxième vaccin. Température : le 14, 39° — 39°,5; le 15, 40° — 40°,6 — 40°,9; le 16, 41°,8; il est tué.

Rate considérablement hyperémiée. Dans tous les organes on trouve les bactériidies en grande quantité; on pouvait suivre toutes les phases de leur destruction.

EXPÉRIENCE X. — Un mouton est inoculé, le 14 octobre. Sa température est, le 14, de 39°, 7 — 40°,1; le 15, de 39°,4 — 40°,4 — 40°,6. Les jours suivants on relève successivement, du 16 au 22, les chiffres 40° — 40°,2 — 40° — 39°,8 — 39°,6 — 39°,7; on le tue le 22.

Les organes ont l'apparence normale. Dans le foie et les reins se trouvent beaucoup de bactériidies détruites. Leurs formes sont plus dégradées que dans les cas précédents. Les fragments quadrangulaires avec angles arrondis dont se composent les bactériidies sont très pâles et se colorent mal avec le bleu de méthylène. Les cultures sont restées stériles.

EXPÉRIENCE XI. — Le 28 octobre, un mouton est inoculé par le deuxième vaccin. Le lendemain matin sa température monte à 40°; il est tué.

Une glande hyperplasiée à l'endroit de l'inoculation, les reins hyperémiés. Dans tous les organes se trouvent les bactériidies déformées; celles qui conservent encore la forme normale, avec bouts tranchés, sont pourtant plus fines et plus courtes. Les bactéries déformées se trouvent surtout dans les reins.

EXPÉRIENCE XII. — Le 29 octobre, six moutons sont inoculés avec le deuxième vaccin. L'un d'eux, qui avait la veille  $39^{\circ},9$ , et le matin  $39^{\circ},9$ , est tué le 30 octobre. Rien à l'endroit de l'inoculation; une forte hyperémie des reins. Dans tous les organes, mais surtout dans la rate, se trouvent toutes les formes de dégradation et de dissolution des bactériides. On remarque aussi des bactéries normales, principalement dans la rate et dans le foie. Sur deux tubes de gélose ensemencés avec chacun de ces deux organes, un a poussé. Les reins ensemencés deux fois n'ont pas donné de culture. Tous les organes ont été examinés pour la seconde et la troisième fois 8 heures et 24 heures après la mort du mouton. Les préparations faites sur des lamelles ont montré une forte diminution dans le nombre de bactéries déformées. Dans la rate, par exemple, on ne voyait, le 2 novembre, que très peu de bactéries. — Deux lapins, inoculés par des émulsions faites avec la rate et le foie, sont restés vivants.

EXPÉRIENCE XIII. — Le 25 novembre, dix moutons sont inoculés par le deuxième vaccin. L'un d'eux a le lendemain à 7 h.  $39^{\circ},4$ , à 9 h.  $40^{\circ},5$ ; il est tué.

La rate est hyperémiée, ainsi que le foie et les reins. Dans la rate, le foie et les muscles, on trouve un grand nombre de bactéries déformées; dans les reins, beaucoup moins. Le sang ne contenait rien.

Une conclusion peut être immédiatement tirée des faits que nous venons d'exposer. *Pendant la fièvre vaccinale, les vaccins inoculés pénètrent toujours dans les organes intérieurs des animaux vaccinés.* Rarement, et seulement au début de la fièvre, ces vaccins se trouvent dans le sang et les organes à l'état vivant et normal. Ordinairement, dans l'acmé de la fièvre, on ne trouve que des bactéries déformées et dissoutes. Vers la fin de la fièvre et jusqu'à cinq jours après la crise, on ne trouve que des débris des vaccins, principalement dans le foie et les reins.

Les méthodes de recherche que nous avons suivies jusqu'ici, en révélant parfaitement bien la quantité de bactéries dans les organes, ainsi que leurs formes, ne donnent aucune idée sur la répartition des bactéries et leurs relations avec les cellules. Ces dernières questions ne peuvent être résolues que sur des coupes.

Ici nous avons trouvé une grande difficulté : les bactéries détruites ne se colorent point par les méthodes ordinaires de coloration. La seule méthode qui nous a donné des résultats satisfaisants est celle de M. le Dr Kühne<sup>1</sup>.

1. Coloration avec deux carmins, puis par le cristal-violet, décoloration par le liquide de Gram et l'huile d'aniline.



Notre principale attention s'est portée sur la rate, où nous cherchions le foyer de destruction des bactéries, et sur les reins, qui se distinguaient par la masse formidable de formes détruites qu'ils contenaient toujours.

Dans la rate, nous trouvions que les bactériidies charbonneuses se trouvaient libres et dans les cellules. Ces dernières étaient toujours celles que M. Metchnikoff a nommées les macrophages, c'est-à-dire les cellules de la pulpe de la rate munies d'un gros noyau arrondi.

Dans les reins, les formes détruites se trouvent dans la couche médullaire, dans les capillaires qui entourent les canalicules tortueux. Ces bactériidies détruites sont ordinairement libres, mais se trouvent aussi souvent dans les cellules. Ces dernières ont le noyau oblong et irrégulier, ainsi que le corps angulaire, et appartiennent à l'endothélium des vaisseaux capillaires.

Avant d'aller plus loin, nous voudrions généraliser nos résultats. Comme nous l'avons dit dans un article précédent, la fièvre charbonneuse est toujours accompagnée de la pénétration de la bactériдие dans les organes intérieurs et de sa destruction dans l'organisme fébricitant, non seulement chez les moutons vaccinés, mais aussi chez les moutons rendus partiellement réfractaires, chez les animaux (chiens, poules, rats, pigeons, spermophiles) plus ou moins naturellement réfractaires, et aussi enfin chez les animaux sensibles au charbon virulent (lapins). Étudions donc, au même point de vue, ces divers cas d'immunité.

Nous allons voir que, toujours, chez tous ces animaux, pendant la fièvre charbonneuse, les organes internes sont remplis de bactériidies détruites.

A cause de la portée théorique de cette notion, nous citerons brièvement quelques exemples.

*Troisième groupe. — Moutons rendus partiellement réfractaires.*

Les moutons partiellement réfractaires sont ceux qui ont eu une fièvre charbonneuse non mortelle et peu considérable, à la suite de l'infection virulente.

Le 30 octobre, un mouton, vacciné par le deuxième vaccin, le 14 octobre, est infecté avec 8 autres sous la peau par le charbon virulent. Sa température est, le 30, de 39°.

Le 31, on relève : 39°,5 — 40°,1 — 40°,6 ; on le tue. Pas d'œdème à l'endroit de l'inoculation. Reins très hyperémiés. Rate un peu grossie. Dans les reins un grand nombre de bactériidies se divisant en coccus ; le foie en contient moins, dans la rate se trouvent toutes les diverses formes transitoires entre les bactériidies saines et les coccus. Aucun organe n'a donné de culture.

*Quatrième groupe. — Animaux naturellement réfractaires.*

EXPÉRIENCE I. — Le 14 juillet, trois chiens sont inoculés par le sang d'un lapin charbonneux dans la plèvre droite. La température du 1<sup>er</sup> est le 14 de 38°,8 — 39°,1 — 39°,5, il meurt dans la nuit du 14 au 15. Le second présente aux mêmes heures 38°,1 — 40°,2, et le 15, à 9 h. du matin, 38°,6, on le tue en ce moment.

A l'autopsie du second on trouve des foyers hépatisés (hépatisation rouge et grise) à la racine du poumon droit, une hyperémie de la rate. Il n'y avait pas de bactériidies dans le sang (les cultures sont restées stériles) ; dans la rate, bactériidies en voie de destruction. Les reins sont pleins de bactériidies divisées en coccus. Dans les foyers hépatisés rouges, infiltration par les leucocytes avec des bactériidies déformées très rares ; dans les foyers gris, mêmes faits et, en outre, des macrophages. Les coupes des reins ont montré les bactériidies déformées dans les capillaires et leurs endothéliums entourant les tubes contournés.

EXPÉRIENCE II. — Le 1<sup>er</sup> janvier 1888, un lapin est tué à une température de 42°,7 à la suite de l'injection, en plusieurs fois, de 50<sup>cc</sup> du premier vaccin dans les veines.

Rate très hyperémiée, reins hyperémiés dans la limite des deux couches corticale et médullaire. Dans la rate on trouve beaucoup de bactéries dans les leucocytes et les macrophages. Dans le foie et le rein, une grande quantité de bactéries qui ont subi la métamorphose régressive.

Les mêmes formes et aussi les bacilles normaux ont aussi été trouvés dans l'urine prise dans la vessie avec toutes les précautions nécessaires.

Il est à remarquer que, contrairement à M. Wyssokowitch, nous avons trouvé, comme phénomène constant consécutif à la fièvre charbonneuse ou pneumonique bénigne, le passage des bactéries dans l'urine. Cette contradiction, pourtant, n'est qu'apparente, parce que M. Wyssokowitch se servait de la méthode de culture sur gélatine, tandis que nos résultats positifs sont obtenus par l'examen microscopique direct. Les cultures



faites avec l'urine sont restées stériles, et les animaux inoculés restaient en vie dans nos expériences.

Nous en tirons la conclusion que les bactéries passent dans l'urine à l'état déformé et mort. Nous n'en avons pas moins établi ce fait d'une grande importance théorique : *les bactéries mortes sont éliminées par les reins.*

*Cinquième groupe. — Animaux susceptibles au charbon.*

Dans notre travail sur la destruction des microbes dans les organismes fébricitants, nous avons relaté dans les expériences XIV, XV, XVI et XVII (V. page 236 de ce volume), que chez les lapins, pendant la fièvre charbonneuse, se produisent les mêmes phénomènes de destruction des bactéries. Nous ne rappellerons ici qu'un seul fait ; dans ces cas de fièvre charbonneuse chez les animaux susceptibles, on réussit toujours à avoir des cultures fertiles en prenant la semence dans les organes internes des animaux sacrifiés.

Tirons maintenant les conclusions.

La fièvre vaccinale, comme toute autre fièvre charbonneuse, est liée à la présence des bactéries inoculées dans les organes internes. Ces bactéries s'y trouvent à l'état normal et vivant, aussi bien qu'à l'état déformé. — Les formes vivantes se trouvent dans le sang du cœur et des capillaires ; les bactéries d'apparence normale et dans les premiers stades de dégradation peuvent être trouvées dans les macrophages de la rate, de la moelle des os et d'autres organes ; les formes détruites sont rejetées dans tous les capillaires avec localisation principale dans la couche médullaire des reins, où les cellules endothéliales s'en emparent, probablement pour les rejeter dans l'urine.

D'après les recherches que nous venons d'exposer, toute la différence entre une fièvre vaccinale bénigne et la fièvre rapidement mortelle est purement quantitative et dépend du nombre des bactériidies vivantes ; tandis que dans la fièvre vaccinale la plupart des cultures,ensemencées avec les organes intérieurs reste stérile, dans la fièvre mortelle chaque culture donne des colonies virulentes. En un mot, nous avons toute raison de dire que les vaccins produisent une affection générale atténuée.

## IV. — MÉCANISME DE L'ACQUISITION DE L'IMMUNITÉ.

b. — *Phénomènes locaux.*

Les phénomènes locaux, observés pendant la vaccination, à l'endroit de l'inoculation, sont tout à fait insignifiants.

A l'extérieur, on ne remarque ordinairement rien, sauf la tuméfaction d'une ou de deux glandes lymphatiques inguinales, qu'on peut reconnaître au toucher. Parfois il y a un léger empâtement ainsi qu'une rougeur à l'endroit inoculé. En incisant la peau, on ne trouve que très rarement un œdème très mince et circonscrit; généralement c'est une hyperémie du tissu cellulaire qui se trouve à l'endroit de l'inoculation. Souvent celui-ci ne peut même être distingué du reste des tissus <sup>1</sup>.

Pourtant, nous savons déjà que là, au point d'inoculation, se passe un phénomène caractéristique pour la vaccination : les vaccins qui commencent par se multiplier, avant d'infecter le sang et tous les organes internes, s'arrêtent après un temps plus ou moins court (24-28 heures, à juger par la fièvre vaccinale) et disparaissent. Autrement dit, il se fait une culture avortée des vaccins. Les phénomènes locaux, dus à l'introduction des vaccins, ont déjà été étudiés par M. *Metchnikoff*, qui a mis en lumière le rôle important des leucocytes dans la destruction locale des bactéries. Mais ses inoculations différaient des nôtres, en ce qu'elles ne conféraient point l'immunité, puisqu'elles ne produisaient pas une fièvre vaccinale; M. *Metchnikoff*, en effet, étudiait l'immunité déjà acquise, comparée à la réceptivité normale.

Pour nous, au contraire, il était important de connaître comment s'arrête une culture déjà commencée, comment se guérit une affection charbonneuse, comment, en un mot, l'état de réceptivité se transforme en état réfractaire, et comment cette transformation s'accuse dans l'affection locale.

D'après le parallèle que nous avons tracé au chapitre précédent entre les deux fièvres vaccinales chez les moutons dans le cours des vaccinations, entre la fièvre charbonneuse chez les

1. Pour les expériences, voir le chapitre précédent.



moutons partiellement vaccinés et la fièvre charbonneuse produite par le virus trop fort ou trop abondant chez les animaux naturellement réfractaires, il est clair que tous ces ordres de phénomènes sont absolument de même nature.

C'est pour cela que, désireux d'étudier leur marche générale, nous avons porté notre principale attention sur les animaux réfractaires se guérissant d'une affection charbonneuse, et nous avons laissé de côté, pour le moment, les moutons vaccinés.

Notre méthode consistait à inoculer, avec le virus virulent, des séries d'animaux, qui étaient sacrifiés l'un après l'autre dans les phases diverses de l'affection.

EXPÉRIENCE I. — Le 14 octobre, à midi, quatre rats blancs sont inoculés par une culture charbonneuse dans du bouillon. Chacun reçoit 4<sup>cc</sup> sous la peau.

Trois heures plus tard l'un d'eux est tué. Œdème gélatineux circonscrit, dans lequel on trouve les bactériidies normales; un petit nombre de celles-ci est contenu dans les leucocytes. La rate est d'une couleur cramoisi-foncé et contient une grande quantité de bactériidies déformées; le foie et les reins contiennent aussi des bactériidies saines.

A 5 heures de l'après-midi, on tue un autre rat. Petit œdème gélatineux dans lequel plusieurs bactériidies sont déformées. La rate contient les formes atténuées : baguettes minces et courtes.

Le lendemain, à midi, on sacrifie un troisième rat. Œdème granuleux au point d'inoculation, infiltration par des leucocytes et macrophages; pas de bactériidies normales, toutes sont déformées, amincies et transformées en coccus. La rate de même ne contient que des débris de bactériidies.

Ainsi, l'œdème typique charbonneux, gélatineux à l'origine, se transforme en œdème granuleux grâce à l'infiltration leucocytaire.

De même, chez les moutons qu'on vaccine avec un vaccin un peu fort, il peut se produire un œdème sous-cutané qui est d'abord mou, gélatineux, et devient progressivement toujours plus dur. Ce phénomène, du reste, s'observe plus souvent sur les moutons qui guérissent (et deviennent réfractaires) après une infection charbonneuse virulente.

De l'autre côté, dans le cas contraire, quand un animal partiellement réfractaire succombe au charbon, on constate l'ordre inverse des phénomènes : l'œdème, assez dur au centre, devient gélatineux vers la périphérie.

Ainsi, le 6 novembre, quatre rats sont inoculés sous la peau par 1<sup>re</sup> du sang charbonneux d'un lapin. Le 7 novembre, à 8 heures, un d'eux est tué. Grand œdème sous la peau de tout l'abdomen. On y trouve beaucoup de bactériidies libres et aussi dans les leucocytes. Dans les organes internes, phénomènes ordinaires de la destruction des bactéries.

A 5 heures, on tue un autre rat. Grand œdème, qui est granuleux au centre et gélatineux à la périphérie. La minorité des bactériidies qui s'y trouvent est contenue dans les leucocytes.

Les deux autres rats sont morts du charbon la nuit suivante.

Il n'est pas inutile de remarquer, comme cela est, du reste, expliqué dans un autre article, que, chez le même animal avec les bactériidies de virulences diverses, et avec le même virus chez les animaux de réceptivité diverse, on peut reproduire toutes les variétés de l'œdème charbonneux, depuis l'exsudation hémorragique gélatineuse jusqu'à l'infiltration leucocytaire. Pour mieux étudier les phénomènes qui se passent à l'endroit de l'infection charbonneuse, nous avons choisi le tissu pulmonaire du chien.

Si on inocule dans le poumon d'un chien le virus charbonneux, on détermine une affection très grave, menant souvent à la mort.

Quelquefois, on ne produit de cette manière qu'une septicémie charbonneuse mortelle. Mais plus souvent c'est une pneumonie fibrineuse qui se produit, avec les stades de l'hépatation rouge et grise. Dans ces cas, on assiste à un combat énergique contre la bactériidie envahissante.

EXPÉRIENCE. — Le 26 mars, à 10 heures, trois chiens sont inoculés par une culture charbonneuse virulente : 3<sup>es</sup> dans la plèvre droite. Leur température avant l'infection était :

	n° 1 <sup>1</sup>	38°,3	n° 2	38°,5	n° 3	39°,1
Le 26, à 5 h. du soir, elle devient	n° 1	39°,6	n° 2	39°,5	n° 3	39°,1
Les jours suivants on trouve						
		8 h. m.		2 h. s.		8 h. s.
Le 27	n° 1	39°,1		38°,6		38°,7
	n° 2	39°,0		38°,4		39°,1
	n° 3	38°,5		38°,3		38°,6
Le 28	n° 1	38°,0		38°,0		38°,4
	n° 2	38°,8		38°,5		38°,6
Le 29	n° 1	38°,1				
	n° 2	38°,5				39°,2

1. Ce chien avait eu une affection charbonneuse dont il était guéri.



## ÉTUDE SUR LA VACCINATION CHARBONNEUSE. — 544

Le n° 3 est mort dans la nuit du 27 au 28. A l'autopsie, on trouve le sang et les organes internes remplis de bactériidies normales.

Le n° 4 a été sacrifié le 29, à 9 heures du matin. On a trouvé une portion hépatisée dans le poumon droit. Les autres organes avaient l'aspect normal.

Dans le tissu hépatisé, le microscope a révélé l'infiltration par les cellules microphages et macrophages en grande quantité. La bactériдие existait presque exclusivement sous les formes dégénérées de coccus et de petites baguettes très fines. Les mêmes formes se trouvèrent dans les autres organes. Pourtant, les cultures faites sur gélose avec le tissu hépatisé et la rate, ainsi que l'infection des souris avec ces deux organes, ont donné des résultats positifs.

EXPÉRIENCE. — Le 14 juillet, à 10 heures du matin, deux chiens sont inoculés par 2<sup>cc</sup> du sang charbonneux d'un lapin dans les plèvres droites.

		9 h. m.	2 h. s.	5 h. s.
Températures	n° 1	38°,8	39°,1	39°,5
du 14.	n° 2	38°,4	38°,5	40°,2

Le 15, on trouve le n° 1 mort pendant la nuit. Le n° 2 marque 38°,6 à 9 heures du matin, il a l'air tout à fait bien portant. Il est sacrifié à 10 heures.

*Autopsie du n° 1.* — Petit œdème gélatineux blanc sur les côtes à l'endroit de l'inoculation. Une partie du lobe supérieur du poumon droit est hépatisée, les autres organes ont l'aspect normal. Le sang du cœur ne contenait pas de bactéries (une culture sur gélose est restée stérile). Le tissu hépatisé est infiltré par les leucocytes en grande quantité, entre lesquels et dans lesquels se trouvent toutes les formes de la bactériдие diminuée et segmentée; on trouve aussi des bactériidies normales, mais amincies. Le tissu pulmonaire autour de l'hépatisation contient aussi une infiltration leucocytaire; les bactéries sont absentes. Dans les autres organes, on trouve les phénomènes ordinaires de la destruction et de l'élimination des bactéries.

*Autopsie du n° 2.* — Hépatisation rouge avec des parties grises à la racine du poumon droit. Rate tuméfiée et hypérémiee. Le sang du cœur ne contient rien (les cultures restèrent stériles). Les portions à hépatisation rouge sont infiltrées par les leucocytes, et ne contiennent que très peu de bactériidies qui sont totalement déformées. Dans l'hépatisation grise, on trouve aussi les macrophages. Dans la rate se rencontrent les bactériidies en voie de destruction; les reins contiennent des bactériidies transformées en coccus.

On voit ainsi partout les mêmes phénomènes : l'infection charbonneuse conduit à l'immigration des leucocytes suivis par les macrophages.

Il nous resterait à répondre à une question de très grande importance théorique. Les bactéries déformées sont-elles toutes contenues dans les cellules phagocytaires, ou bien leur métamorphose régressive s'accomplit-elle en dehors du corps cellulaire? Malheureusement, mes recherches ne me permettent pas de résoudre cette question d'une manière précise. Cependant, l'histoire des œdèmes charbonneux chez les rats qui ont présenté d'une manière typique et uniforme les changements régressifs des bactéries nous a paru très instructive à ce point de vue. Cette métamorphose régressive avait l'air d'avoir lieu en dehors du corps cellulaire, puisqu'elle était survenue uniformément dans les grands amas des bactériidies. Cependant, la coloration de celles-ci sur les coupes ne nous a pas réussi, ce qui nous empêche de nous prononcer d'une manière décisive.

#### V. — LA THÉORIE DE LA FIÈVRE VACCINALE.

Nous avons vu dans les chapitres précédents que la vaccination consiste en une multiplication des vaccins, à l'endroit de l'inoculation, suivie par une immigration cellulaire; en un passage des vaccins dans le sang et dans les organes internes; en leur destruction, qui se fait par la métamorphose régressive avec le type principal de la *dissolution*; enfin, en une élimination des formes détruites par les reins.

Il nous reste à rechercher la causalité et la signification de ces faits.

Il n'est pas douteux que le développement local des vaccins ne soit arrêté par l'influence leucocytaire.

Pour le prouver, nous n'avions qu'à imiter l'expérience classique de M. Metchnikoff, qui introduisait les germes charbonneux dans l'œil des animaux réfractaires, et qui constatait leur développement, suivi de l'émigration cellulaire et de phagocytose<sup>1</sup>.

Si ce sont les cellules leucocytaires qui, infiltrant l'endroit de l'inoculation, arrêtent la multiplication microbienne et coupent la fièvre vaccinale, on devait s'attendre alors à trouver une fièvre beaucoup plus intense, en introduisant les mêmes vaccins

1. Voir ce Recueil, n° 7, 4887.



dans la chambre antérieure de l'œil, où la leucocytose ne peut se faire que très lentement. C'est ce que nous avons constaté, en effet.

Le premier vaccin, introduit dans la chambre antérieure de l'œil d'un mouton, provoque une fièvre intense qui monte à 42° et qui dure 4 à 5 jours, parfois même toute une semaine.

De même, chez le lapin qui est tout à fait insensible à l'action du premier vaccin, on peut pourtant produire une fièvre légère par l'inoculation dans l'œil.

Ainsi, le 17 décembre, deux lapins sont inoculés sous la peau chacun par 1<sup>cc</sup> du premier vaccin.

Leur température resta normale les trois jours suivants, se tenant entre 39°,3 et 39°,8.

Le 21 décembre, on leur inocule 1/8<sup>cc</sup> du même vaccin dans l'œil droit. Le même soir, leur température monte à 40°,5 et 40°,7, pour tomber à 39°,4 et 39°,5 le lendemain.

Le 31 décembre, à 10 heures du matin, un autre lapin est inoculé par le premier vaccin dans l'œil droit. La température est

à	10 h.	12 h.	2 h.	4 h.	7 h.	9 h.	10 h. s.
de	39°,4	38°,8	39°	38°,5	<b>40°,4</b>	40°	39°,9.

Chez le chien aussi, le virus charbonneux introduit dans l'œil détermine souvent une fièvre.

Nous nous croyons autorisé à tirer de ces faits la conclusion que le développement local des vaccins pendant la vaccination est arrêté par l'immigration leucocytaire.

De cette manière, seulement, on peut s'expliquer comment les vaccins qui commencent à se multiplier dans un organisme susceptible, finissent par être détruits comme dans un animal réfractaire.

Pour aller plus loin, il faut expliquer comment se produit cet arrêt local des vaccins et quelles forces conduisent à leur métamorphose régressive? Se ferait-il, par suite de l'immigration leucocytaire, un changement, nuisible aux vaccins, dans leur liquide de culture, ou bien sont-ce uniquement les cellules blanches elles-mêmes qui réduisent les vaccins par une action phagocytaire?

Nous avons fait un grand nombre d'expériences de culture

de la bactériodie charbonneuse dans le liquide retiré de l'œil des moutons inoculés dans cet œil ou sous la peau. Ces recherches nous autorisent à conclure qu'un changement nuisible à la culture bactériodienne peut être démontré expérimentalement.

Le liquide était retiré de la chambre antérieure de l'œil avec des pipettes flambées, qui étaient ensuite fermées à la lampe à leurs bouts effilés ; en retirant le coton de l'autre bout on y semait les germes charbonneux ; le coton était ensuite remis à sa place et recouvert par une coiffe de caoutchouc, afin d'éviter l'évaporation.

Le 20 décembre, dans un liquide pris dans l'œil d'un mouton qui, inoculé dans cet œil par le premier vaccin, venait d'avoir une fièvre vaccinale, on sème les germes charbonneux.

Le 21, les germes ont poussé, mais au lieu d'une culture normale, ils ont produit toutes les formes régressives déjà connues, c'est-à-dire les bactériodies divisées en petits tronçons gonflés et pâles, et notamment les bacilles amincis, quatre fois moins larges, et même davantage, que la bactériodie normale <sup>1</sup>.

Dans les cultures, faites dans des conditions identiques avec le liquide de l'œil des moutons frais, nous n'avons jamais trouvé de formes amincies. Les formes gonflées et pâles peuvent y être trouvées quelquefois, quoique en quantité infiniment moindre <sup>2</sup>.

Il résultait de cette expérience qu'il y avait dans notre liquide un changement qualitatif nuisible à la bactériodie.

En outre, nous avons remarqué que cette modification ne se bornait pas à l'œil inoculé : le liquide, pris dans l'autre œil du même mouton, donnait aussi des cultures à type régressif.

1. Les expériences de M. Nuttall (*Zeitschrift. Hygiene*, 1888), qui s'est occupé d'une question semblable à la nôtre, diffèrent de nos expériences sous plusieurs rapports : 1<sup>o</sup> M. Nuttall étudiait l'action instantanée de ses liquides de culture, tandis que nous examinons nos cultures après 24 et 48 heures passées à 35° ; 2<sup>o</sup> M. Nuttall n'a pas fait d'expériences de contrôle, consistant dans l'étude de l'action immédiate de divers bouillons ordinaires. Toutes nos expériences étaient comparatives ; 3<sup>o</sup> M. Nuttall n'a observé que les formes *dissolutives*, tandis que le plus frappant phénomène dans nos expériences était la présence des formes *atténuées*.

On va voir que nos résultats sont très différents aussi.

2. On sait, du reste, que le liquide, pris dans la chambre antérieure de l'œil, est un des meilleurs milieux nutritifs pour la bactériodie charbonneuse.

Or, par des expériences répétées, nous avons réussi à trouver les conditions de cette modification : *elle se produit par suite de la fièvre vaccinale.*

Chaque fois qu'une infection sous-cutanée ou autre, par le premier ou le deuxième vaccin ou par le virus charbonneux, détermine une fièvre manifeste (de  $1\frac{1}{2}$  à 2 degrés), on trouve que le liquide oculaire devient impropre, pour un certain temps, à la culture charbonneuse. Cette modification devient d'autant plus manifeste que la fièvre précédente était plus considérable. Voici à titre d'exemples quelques expériences :

Le 24 février, le sang charbonneux d'un lapin est semé dans les liquides oculaires, pris chez deux moutons qui venaient d'avoir une fièvre vaccinale légère (au maximum de  $40^{\circ},6$ ) par suite de l'introduction du deuxième vaccin dans les yeux. Quelques formes régressives ont été trouvées le lendemain, dans les cultures faites avec les liquides des yeux inoculés.

Le 25 février, on prélève du liquide, vers la fin de la fièvre charbonneuse, dans l'œil d'un mouton qui a été inoculé la veille par le virus charbonneux sous la peau. Le 25, à 8 heures du matin, la température du mouton était de  $41^{\circ},4$ ; à 5 heures du soir, de  $41^{\circ},3$ . Le liquide est stérile. On y sème le charbon, pris dans une culture faite avec la rate d'un lapin charbonneux.

Le 26 février, la culture présente tous les degrés de destruction de la bactériodie charbonneuse. Pourtant elle a conservé la virulence, puisque inoculée à un lapin, elle l'a tué.

Le 1<sup>er</sup> mars, la même culture de la rate charbonneuse est semée dans un liquide pris chez un autre mouton *après la fin* d'une fièvre charbonneuse très forte, causée par l'inoculation sous-cutanée. Le lendemain, cette culture n'a présenté que des formes régressives, diminuées et dissoutes. La gélose,ensemencée par elle, est restée stérile et le lapin inoculé n'est pas mort.

Le 1<sup>er</sup> mars, un chien est tué après une fièvre charbonneuse. La culture charbonneuse est semée dans les pipettes remplies par le liquide de la chambre antérieure de l'œil du même chien. Des expériences comparatives m'ont montré qu'avec des chiens frais on n'obtient que des cultures normales dans ces conditions.

Ces cultures présentent le lendemain des formes régressives



avec une grande quantité des bactéries à fourreau <sup>1</sup>. Chaque jour on les recultive dans le même liquide et, le 5 mars, on en ensemence de la gélose. Le 5, cette dernière culture est inoculée à un lapin qui reste en vie. Des expériences parallèles ont été faites avec le même résultat sur le sang de ce chien.

On voit ainsi que pendant la fièvre qui accompagne la destruction de la bactériémie charbonneuse, il se produit une modification chimique dans les liquides de l'organisme fébricitant, nuisible à la culture de la bactériémie.

D'après nos expériences, cette modification peut persister jusqu'à 14 jours. Mais d'un autre côté, elle n'existe plus après un mois, passé après la fièvre. Maintes fois, nous avons étudié sous ce rapport le liquide oculaire, pris chez les moutons vaccinés un mois et davantage auparavant, et il nous a toujours donné des cultures charbonneuses normales.

Il y a à ajouter un fait important : les animaux, morts charbonneux, ne nous ont pas présenté cette modification antiseptique, même après une fièvre charbonneuse prolongée. Dans ces cas, le liquide oculaire peut ne pas contenir des bactériémies, mais, ensemencé, il donne de belles cultures. Il s'ensuit que le développement de la bactériémie détruit cette modification antiseptique <sup>2</sup>.

Revenant maintenant à notre question sur les relations entre la destruction des bactériémies et l'immigration cellulaire au point d'inoculation, nous voyons qu'elle n'a pas reçu de réponse directe, et qu'à la place, nous avons trouvé une relation qui lie la fièvre à une modification chimique antiseptique des liquides de l'économie. Nous pouvions nous attendre à un pareil résultat, car vu la diffusion rapide qui se fait dans le corps vivant, il ne saurait y être question d'une modification chimique locale des liquides, et notre investigation ne pouvait y déceler qu'une

1. Voir leur description dans le premier chapitre, ainsi que dans ce volume, p. 236.

2. Signalons ici quelques particularités des cultures que nous venons de décrire. D'abord, on remarque souvent macroscopiquement, avec ces liquides oculaires ainsi modifiés chimiquement, que les cultures charbonneuses, au lieu de s'immerger en flocons, s'étalent en nappe à la surface du liquide. Puis, il est étonnant de voir avec quelle rapidité les bactériémies forment les germes dans ces conditions : en moins de 20 heures. Du reste, ce dernier fait se retrouve souvent avec le liquide oculaire normal.

modification qui retentisse sur toute l'économie, comme le fait la fièvre charbonneuse.

Cette fièvre elle-même et l'immigration cellulaire ne constituent du reste que deux aspects d'un seul et même phénomène, la réaction organique contre l'invasion des microbes, et comme on peut croire que les mêmes armes servent aux cellules leucocytaires pour le même combat sur des champs de bataille différents, j'attribue aux leucocytes émigrés au point d'inoculation, ainsi qu'à ceux de la rate et de la moelle des os, dans les organismes fébricitants, la faculté d'excréter une substance qui contribuerait à l'arrêt de la végétation parasitaire.

Ici se présente une question importante. Pourrait-elle, cette substance antiseptique, agir par elle seule, et arrêter l'infection bactérienne en dehors de l'influence leucocytaire ?

On peut rendre un mouton tellement réfractaire au charbon qu'il n'a plus de fièvre, même après l'inoculation de quantités considérables de virus charbonneux. Dans ce cas, l'injection sous-cutanée virulente n'est suivie d'aucune réaction locale appréciable : on ne constate aucun œdème ni aucune tumeur au point d'inoculation. En recueillant la sérosité sur ce point, on n'y trouve pas d'immigration cellulaire, et cinq à douze heures après l'injection, nous y avons pourtant constaté de nombreuses formes dissoutes des bactériidies, en dehors des leucocytes, qui étaient très rares. Mais ces cas sont exceptionnels. Si on avait inoculé plus de virus, ou du virus plus fort, on aurait retrouvé la fièvre, l'œdème granuleux au point d'inoculation, et tous les phénomènes de la leucocytose. Concluons donc que l'antisepsie chimique que nous avons découverte, et qui est passagère et incomplète, ne peut pas servir à elle seule à expliquer l'état réfractaire absolu et persistant.

Je n'ai aucune donnée précise sur la nature de cet antiseptique. J'ai cherché vainement jusqu'ici à l'assimiler à un ferment peptique. Comme dans un travail antérieur<sup>1</sup> j'avais présenté la fièvre comme une réaction cellulaire, dirigée contre l'invasion des microbes, et comprenant dans son mécanisme l'action d'une substance pyrogène, on pourrait supposer que c'est la même substance qui jouit des propriétés pyrogènes et antiseptiques.

1. Voir ces *Annales*, t. II, p. 229.

Mais tout ceci est délicat et demande beaucoup de réserve. N'oublions pas que l'acide carbonique qui sature les tissus pendant la fièvre peut aussi jouer un rôle nuisible pour le développement de la bactériémie charbonneuse, et même qu'on peut lui attribuer à la rigueur quelques-uns des faits relatés dans ce chapitre.

## VI. — LA THÉORIE DE L'IMMUNITÉ ACQUISE.

Notre point de départ dans l'étude de la vaccination charbonneuse a été la théorie phagocytaire, d'après laquelle l'immunité proviendrait de l'habitude prise par les globules blancs de digérer les microbes pathogènes <sup>1</sup>.

Les recherches que nous venons d'exposer ne sont pas tout à fait favorables à cette manière de voir. Les savants (Metchnikoff, Hesse), qui ont étudié le mode de réaction des organismes réfractaires au charbon, attribuent aux microphages, c'est-à-dire aux leucocytes à noyau fragmenté, le rôle actif dans la destruction de la bactériémie. D'après nous, au contraire, ce sont toujours les macrophages qui servent à la destruction des vaccins charbonneux dans les organes internes.

Il faut donc chercher l'explication de l'immunité acquise ailleurs que dans l'habitude prise par les leucocytes de digérer les microbes pathogènes. C'est à quelque fait dépendant de la vie des microbes, et non de la façon dont ils sont digérés, que nous devons nous adresser.

On a dit <sup>2</sup> que l'inoculation de quantités très grandes de bactériémies mortes pouvait conférer l'immunité. L'expérience prouve le contraire. Ainsi, le 6 décembre, j'inocule à 2 lapins 12<sup>cc</sup> d'une culture du second vaccin, stérilisée par un chauffage de 20 minutes à 120°, et, le 9 décembre, à 4 autres lapins, 12 et 24<sup>cc</sup> d'une culture stérilisée de charbon virulent, remplie de flocons bactériémiens. Ces six animaux, inoculés le 17 décembre par une culture charbonneuse, succombent au charbon comme deux lapins témoins, inoculés en même temps.

1. Voir dans ces *Annales*, t. I, p. 324, le Mémoire de M. Metchnikoff.

2. Voir Wyssokowitch, *Vratch.*, 1888. Mémoire curieux, où l'auteur prétend avoir trouvé la théorie phagocytaire avant M. Metchnikoff et la vaccination chimique avant les élèves de M. Pasteur. Quant aux quelques expériences que contient cet article elles sont au-dessous de toute critique. Par exemple, pour contrôler l'immunité acquise des moutons, l'auteur emploie comme témoin un lapin.



De même on fait avec une culture charbonneuse stérilisée les inoculations suivantes dans la veine de l'oreille : Le 20 décembre, un lapin reçoit 22<sup>cc</sup> ; trois autres, chacun 44<sup>cc</sup>. Le 23, 2 lapins, chacun 50<sup>cc</sup> ; le 24, 3 lapins, 50<sup>cc</sup> chacun. Le 30, deux de ces derniers lapins reçoivent encore 30<sup>cc</sup> chacun. Tous ces lapins, inoculés plus tard à divers intervalles avec le virus charbonneux ou le second vaccin, ont tous succombé au charbon.

Le 22 et le 24 décembre, deux lapins reçoivent chaque jour 75<sup>cc</sup> d'une culture charbonneuse stérilisée, soit, en tout, 150<sup>cc</sup>. Inoculés le 27 janvier par du virus charbonneux, en même temps qu'un lapin témoin, les trois animaux succombent le 29 au charbon. La digestion de 150<sup>cc</sup> de culture de bactériidie ne confère donc aucune immunité.

La vie de la bactériidie est donc nécessaire pour que sa destruction puisse conférer l'immunité. En d'autres termes, des deux phénomènes de la vaccination, multiplication des vaccins et leur destruction dans les organes, c'est le premier qui est important pour l'acquisition de l'immunité, et puisque c'est le vaccin vivant qui agit, ce ne peut être que par ses produits spécifiques qui n'existent pas dans les cultures stérilisées, puisque celles-ci sont tolérées sans aucun symptôme morbide.

On arrive à la même conclusion en étudiant la réaction locale. Les bactériidies mortes, injectées sous la peau des lapins, ainsi que les bactériidies vivantes chez les animaux réfractaires, produisent localement une immigration leucocytaire qui peut même aboutir à un abcès, si la quantité de bactériidies injectées est suffisante. Ce n'est donc pas dans cette immigration cellulaire qu'il faut chercher l'explication de l'immunité, mais bien plutôt dans le phénomène contraire, dans l'exsudation plasmatique qui se fait chez les animaux susceptibles, dans l'œdème charbonneux.

En étudiant comparativement cet œdème, avec le charbon virulent chez les animaux diversement réfractaires et avec des virus de virulence croissante, chez une même espèce animale, on constate les faits suivants :

La bactériidie morte et la bactériidie atténuée chez les animaux susceptibles, la bactériidie virulente chez les animaux réfractaires, ne produisent que ce que j'ai nommé l'œdème granuleux, c'est-à-dire une infiltration leucocytaire abondante.

La bactériémie virulente chez les animaux susceptibles produit un œdème plasmatique qui est incolore ou jaunâtre avec la bactériémie d'une virulence moyenne <sup>1</sup> et hémorragique avec la bactériémie très virulente <sup>2</sup>.

On s'expliquerait très bien ces phénomènes en admettant que la bactériémie virulente a la propriété, comme telle, de former un poison produisant une exsudation plasmatique, et qui n'existe pas dans la bactériémie tuée.

Les animaux réfractaires seraient réfractaires à ce poison et les animaux vaccinés seraient habitués à l'intoxication. Cette habitude se manifesterait le plus visiblement pour les cellules endothéliales des capillaires, puisque ce sont elles qui régissent l'exsudation, mais elle ne se bornerait pas à ces cellules.

Nous pouvons même faire un pas de plus et essayer de préciser la nature de cet agent toxique : on a le droit de penser que c'est un alcaloïde et qu'il est en même temps l'agent de la mort par le charbon.

On peut, en effet, avec un alcali quelconque, reproduire, *grossio modo*, les phénomènes principaux de l'infection charbonneuse, c'est-à-dire l'œdème et l'abaissement de la température <sup>3</sup>. On peut aussi, avec des alcalis plus ou moins énergiques, reproduire l'œdème hémorragique jaunâtre ou incolore.

Ainsi, le 1<sup>er</sup> août, à 10 heures du matin, j'inocule 1 cent. cube d'ammoniaque du commerce sous la peau d'un lapin. Voici le relevé de ses températures <sup>4</sup>.

9 h. 45 m.	39°,3	2 h.	38°,3
10 h.	39°,3	2 h. 30 m.	38°,2
10 h. 30 m.	39°,0	3 h.	38°,4
11 h.	38°,7	3 h. 30 m.	36°,8
11 h. 30 m.	38°,6	4 h.	38°,
12 h.	38°,7	4 h. 30 m.	37°,8
12 h. 30 m.	38°,5	5 h. 30 m.	37°,6
1 h.	38°,6	6 h.	37°,7
1 h. 30 m.	38°,4	7 h.	37°,3 mort.

1. Le deuxième vaccin, par exemple, chez les moutons et les lapins, produit assez constamment un œdème incolore.

2. Cet œdème hémorragique s'observe fréquemment chez le mouton, tandis que le lapin succombe souvent avec une réaction très limitée, mais il y a toujours une suffusion hémorragique au point d'inoculation.

3. La fièvre n'est que la réaction organique, tandis que l'abaissement de la température est l'effet direct de l'infection. V. ces *Annales*, t. II, n° 3.

4. A comparer avec la température des lapins, inoculés avec l'œdème charbonneux. V. ces *Annales*, t. II, n° 5.

A l'autopsie, on trouve un œdème gélatineux hémorragique très abondant à l'endroit de l'inoculation.

On voit donc qu'on a le droit d'attribuer à un alcali les phénomènes locaux et généraux de l'inoculation charbonneuse. Du reste, M. Hesse a réussi à isoler un alcaloïde des cultures du charbon; malheureusement il n'a pas étudié son action vaccinatrice.

Nous résumerons tout ce qui est exposé dans cet article dans les conclusions suivantes :

La vaccination charbonneuse est un effet de la vie et de la multiplication des vaccins dans le corps des animaux. A cette reproduction est nécessairement liée la formation de produits toxiques, peut-être d'alcaloïdes spécifiques, et elle se traduit au dehors par les phénomènes de la fièvre vaccinale.

Cette culture passagère des vaccins dans le corps a pour effet l'assuétude de toute l'économie vis-à-vis de l'action nocive spécifique de la bactériémie charbonneuse. Cette assuétude se fait probablement dans toutes les cellules : nerveuses, leucocytaires et endothéliales. Habituees à ce poison, ces cellules ne se paralysent plus par son action, et peuvent se comporter vis-à-vis de la bactériémie virulente comme vis-à-vis d'une bactérie banale ou d'un corps étranger quelconque. Ainsi par exemple, les cellules endothéliales des capillaires, au lieu de se contracter pour laisser échapper l'exsudation séreuse, ne laissent passer que les leucocytes, et ces derniers, au lieu d'être paralysés dans leurs fonctions, détruisent énergiquement les microbes et sécrètent peut-être une substance antiseptique.

Cette explication de l'immunité acquise me semble la seule qui rende compte de tous les faits de la vaccination par éléments figurés, de celle qui a fait l'objet de notre étude, et qui soit en accord avec l'existence de la vaccination chimique.

---



# VIBRIO METSCHNIKOWI

## SON MODE NATUREL D'INFECTION

PAR M. N. GAMALÉIA

---

Dans un article précédent (V. ce vol., p. 482) nous avons fait l'histoire d'une maladie naturelle des poules qui offre beaucoup d'analogie avec le choléra asiatique. Dans sa marche clinique on trouve comme symptôme constant l'abaissement de la température du corps<sup>1</sup>, ce qui est caractéristique aussi pour le choléra humain; on peut constater de même la diarrhée et les mouvements péristaltiques de l'estomac qui font que le gosier, qui a la réaction légèrement alcaline à l'état normal, a toujours la réaction fortement acide chez les poules et les pigeons morts de cette maladie nouvelle.

L'anatomie pathologique des deux formes morbides a des ressemblances encore plus grandes : inflammation aiguë de tout le canal digestif, se localisant surtout dans les portions de l'intestin les plus voisines de l'estomac; dans l'intestin, liquide copieux avec flocons d'épithéliums exfoliés; rate petite et pâle; absence complète des bactéries dans le sang des animaux adultes. De plus, parenté étroite dans la cause du mal qui, établie expérimentalement pour la maladie des poules, est devenue très probable pour la maladie humaine, car des deux côtés, ce sont des vibrions qui ne diffèrent entre eux que par des caractères peu importants, caractères d'*adaptation* que l'expérimentateur peut souvent modifier à son gré<sup>2</sup>; enfin, comme dernier signe d'une

1. Dans mon article précédent, p. 482, il faut lire, au lieu de « température voisine de la normale » : température au-dessous de la normale, comme cela est du reste indiquée par les chiffres de 41°-38°.

2. Voir notre article sur la vaccination charbonneuse dans ce même numéro.

connexion très étroite de deux formes, elles se laissent mutuellement vacciner l'une contre l'autre.

On devait conclure de toutes ces analogies qu'on pourrait rencontrer des points semblables dans l'étiologie des deux maladies et plus particulièrement que la maladie expérimentale pourrait servir à la solution des nombreuses questions laissées indécises par l'étude de la maladie humaine.

On sait notamment que la découverte de M. Koch a conduit à un désaccord évident entre la bactériologie et l'épidémiologie du choléra.

L'étude épidémiologique avait conclu que le choléra n'est pas contagieux, que pour pouvoir devenir infectieux, son germe doit mûrir dans le sol, ce qui exige chez celui-ci des propriétés spéciales ; que du sol le germe morbide devait pénétrer dans l'air, qui est le véhicule probable de la contagion épidémique. La bactériologie au contraire n'a admis qu'un seul mode d'existence pour la virgule cholérique, qui ne *devait* pas avoir de germes, et un seul mode d'infection, l'infection par l'estomac. Encore y avait-il là quelques difficultés, car les bactéries de Koch périssent très facilement dans un milieu acide. Il avait donc fallu admettre, pour sauver du naufrage le pouvoir pathogène des bacilles-virgules, que les cholériques s'infectaient seulement lorsque, par indigestion ou par excès dans leur régime, disparaissait la réaction acide de leurs estomacs. On était ainsi conduit à une fausse interprétation des *diarrhées prémonitoires* des épidémies, considérées auparavant comme les premiers symptômes d'une infection, envisagées maintenant comme les causes prédisposantes nécessaires.

D'après cette courte analyse, on voit facilement que l'étiologie du choléra est loin d'être élucidée par la découverte du bacille-virgule.

Or, il arrive que notre maladie cholérique des poules est très instructive au point de vue de ces questions étiologiques.

Notre maladie n'est pas *contagieuse*. Maintes fois, nous avons laissé des pigeons, des poulets et des cobayes neufs dans les mêmes cages que les animaux malades de la *gastroentérite* cholérique, et ils n'ont *jamais* contracté la maladie ; inoculés, quelque temps après, ils mouraient avec les lésions habituelles. D'un autre côté, les résultats obtenus par l'inoculation sous-cutanée

et intramusculaire, plaident contre l'idée de la contagion immédiate. Cette inoculation, mortelle sans exception pour les pigeons, ne l'est plus pour les poulets et encore moins pour les poules. Ces dernières ne sont tuées dans ce mode d'infection que par des doses massives, impossibles à rencontrer dans la nature.

Ainsi, les jeunes poulets exigent, pour une inoculation mortelle, plus d'un centimètre cube d'une émulsion dans du sang de pigeon de passage, tandis que les poules adultes supportent impunément jusqu'à 3<sup>cc</sup> injectés à la fois dans les muscles.

Il est évident que ce mode d'infection, si inefficace même avec notre virus renforcé<sup>1</sup>, ne peut jouer aucun rôle dans la nature.

On pouvait croire que notre maladie, qui se localise exclusivement dans l'intestin, a sa porte d'entrée directe dans le canal digestif, par la bouche et le gosier.

En effet, nous avons réussi à reproduire très facilement l'infection mortelle chez les poulets en leur offrant à boire des cultures de vibriens ou le sang d'un pigeon de passage (V. p. 486).

Mais nous avons bientôt renoncé à attacher de l'importance à ce mode d'infection par le gosier, car il ne peut faire mourir que les poulets très jeunes. Les poulets un peu grandis deviennent manifestement malades, mais ne meurent pas, et les poules adultes, au contraire, comme les pigeons adultes, ne sont aucunement incommodées par des quantités très grandes (plusieurs centimètres cubes) de virus mangé et bu, et n'acquièrent même pas l'immunité par suite de cette infection.

Si donc on se bornait aux trois modes d'infection précédents : inoculation sous-cutanée, intramusculaire, et nourriture, l'étiologie de notre maladie resterait tout aussi obscure que celle du choléra asiatique ; d'autant plus que, dans notre cas, on ne pouvait recourir à des indigestions pour avoir la réaction alcaline des premières voies : le contenu du gosier des oiseaux est alcalin à l'état normal. De plus, notre virus de passage, employé pour l'infection des poules, est plus virulent que celui qui se trouve dans la nature, et pourtant, nous n'avons pas réussi à réaliser l'infection mortelle des poules.

Celle-ci se rencontre cependant très souvent dans la nature, et nous avons observé des épizooties sur les poules adultes qui

1. Voir ces expériences, page 485 de ce recueil.



en emportaient 10 0/0 dans les poulaillers. Pour expliquer ces épizooties, il fallait donc rechercher un mode d'infection plus efficace.

Nous avons trouvé, en effet, que l'introduction intrapulmonaire du virus, qu'elle soit faite par la trachée ou à travers les parois de la poitrine, constitue un mode d'infection de beaucoup plus dangereux que tous les autres. Introduits dans les poumons, les vibrions de Metschnikoff tuent non seulement les pigeons, les cobayes et les poulets, mais aussi les animaux les plus résistants, comme les poules et les lapins.

Nous citerons ici quelques expériences.

Le 18 septembre, un pigeon est inoculé par la trachée avec le sang d'un pigeon de passage (1/4 de c. c.).

Ce pigeon meurt la nuit. A l'autopsie on trouve l'intestin cholérique, la rate exsangue, une hyperémie en foyers des poumons, une exsudation pleurétique séreuse. Dans le sang, dans l'exsudation pleurétique, dans le *contenu intestinal*, on constate l'existence des vibrions de Metschnikoff. Le contenu intestinal sert à l'inoculation intratrachéale d'un pigeon frais qui meurt la nuit suivante. On lui trouve à l'autopsie les mêmes lésions, sauf celles de la cavité thoracique; les *poumons ont l'apparence normale*. Son sang donne une culture pure des vibrions de Metschnikoff.

Le 14 septembre, deux poules sont inoculées par la trachée avec 1<sup>cc</sup> de sang de pigeon de passage. Elles meurent pendant la nuit, en présentant à l'autopsie les lésions habituelles de la gastroentérite cholérique avec les poumons hyperémiés par îlots.

Le 30 septembre une poule et un coq sont inoculés par la trachée avec 1<sup>cc</sup> de sang de pigeon de passage. Le coq meurt la même nuit et la poule le 2 octobre. A l'autopsie on leur trouve les lésions habituelles de la gastro-entérite cholérique.

Le 2 octobre, deux poulets, âgés de 3 ou 4 mois, sont inoculés à travers le larynx par 1<sup>cc</sup> de sang de pigeon de passage. Ils meurent la même nuit de la gastroentérite cholérique.

On voit ainsi, que ce nouveau mode d'infection est doué d'une gravité extrême, suffisante pour foudroyer en 20 heures une poule adulte. Comme c'est, du reste, le seul mode d'infec-

tion qui reproduit l'affection mortelle des poules, nous sommes obligés de conclure que c'est lui qui a lieu dans la nature.

D'un autre côté, nos expériences précitées prouvent que les vibrions de Metschnikoff ont de la prédilection pour la localisation intestinale; quoique injectés dans les poumons, c'est dans le contenu intestinal qu'ils vont se cultiver pour produire l'intoxication cholérique. Cette localisation de prédilection ne se fait pas seulement à la suite de l'injection pulmonaire; elle est l'apanage des vibrions de Metschnikoff quel que soit le mode de leur inoculation. Nous en avons donné des preuves en ce qui concerne l'inoculation intramusculaire et trachéale des pigeons. Voici quelques autres exemples :

Le 22 juin, un jeune lapin est inoculé sous la peau par 2<sup>cc</sup> de sang de pigeon de passage. Il meurt le 24 juin. A l'autopsie, on lui trouve un œdème gélatineux jaunâtre à l'endroit de l'inoculation, une rate hyperémiée, tout l'intestin inflammé et rempli d'un liquide jaunâtre avec des flocons d'épithélium. L'examen microscopique révèle des bacilles-virgules, rares dans le sang, et très abondants dans le contenu intestinal.

Le 26 juin, un spermophile est inoculé dans le péritoine par 1<sup>cc</sup> du sang de pigeon de passage. Il meurt le lendemain en présentant une hyperémie de l'intestin, qui est rempli d'un liquide abondant. Dans son sang et son intestin, on trouve les vibrions de Metschnikoff.

On peut donc affirmer en règle générale que le vibron de Metschnikoff a une prédilection pour la localisation intestinale, quelle que soit sa porte d'entrée. Nous voyons ici nettement la fausseté d'une des prétendues lois de Wyssokowitch qui n'admettait pas le passage des bactéries dans l'intestin <sup>1</sup>.

Ainsi se trouve résolue la question que nous nous sommes posée au commencement de ce travail.

L'infection naturelle des poules par la gastro-entérite cholérique se fait très probablement à travers les voies aériennes. Passant par les poumons, les vibrions de Metschnikoff vont dans l'intestin pour y produire des lésions spécifiques.

1. Disons en passant que les autres « lois » nous semblent tout aussi fausses; nous avons constaté, par exemple, l'élimination des bactéries charbonneuses et pneumoniques mortes par l'urine.

Revenant maintenant aux dissentiments signalés entre la bactériologie et l'épidémiologie du choléra asiatique, nous voyons que l'analogie avec notre maladie des poules plaide en faveur de la thèse épidémiologique. Dans un travail prochain, nous prouverons, par des recherches expérimentales directes sur l'étiologie du choléra asiatique, que cette analogie se vérifie en tous points.

Avant de terminer, nous voudrions tirer quelques conséquences des faits que nous venons d'exposer. Nous avons trouvé que l'inoculation laryngienne des pigeons est une excellente méthode expérimentale pour la recherche des vibrions de Metschnikoff. Nous avons cité plus haut une expérience, où une injection, faite avec le contenu intestinal d'un pigeon cholérique, et malgré la présence d'un grand nombre de bactéries différentes, a reproduit néanmoins une gastro-entérite classique. Or, avec d'autres modes d'infection, on ne réussit pas à la reproduire avec des cultures impures.

D'un autre côté, cette sensibilité très grande de tous les animaux vis-à-vis de l'introduction pulmonaire du virus nous force à revenir sur nos expériences de l'infection des cobayes par la nourriture. (Voir ce recueil, p. 486.) Il est bien probable, que les cobayes morts se sont infectés par les poumons où le virus pouvait très bien arriver par la bouche. Cela est d'autant plus probable, que dans ces cas on constate souvent une pleurésie séreuse.

---



# RECHERCHES SUR LE POLYMORPHISME DU CLADOSPORIUM HERBARUM,

PAR M. E. LAURENT.

---

Il existe parmi les champignons une foule de formes d'organisation peu compliquée, très répandues dans la nature, et qui depuis longtemps ont attiré l'attention des botanistes. Ce sont les Hyphomycètes ou Mucédinées. Les uns, au début des études cryptogamiques, les considéraient comme des champignons complets, autonomes, et en décrivaient les aspects si variés comme autant d'espèces distinctes. D'autres, à une époque qui n'est pas si lointaine, admettaient pour ces organismes un polymorphisme presque indéfini.

Par leurs caractères souvent peu distincts, la succession de leurs formes sur un même substratum, les Hyphomycètes semblaient se prêter à merveille à ce transformisme. Il fallut les recherches de de Bary, de M. Brefeld et de M. Van Tieghem pour ramener les esprits à des idées plus saines. Comme il advient souvent à la suite des controverses, l'autonomie des champignons inférieurs parut de plus en plus évidente. Quelques cas de polymorphisme restaient cependant incontestables ; tel est le *Botrytis cinerea*, forme conidienne du *Peziza Sclerotiorum*.

Après les récents travaux sur le développement des champignons inférieurs, les botanistes qui s'en occupaient au point de vue systématique, reprirent la description détaillée de ces végétaux. Les formes considérées comme espèces devinrent de plus en plus nombreuses. Pour s'en convaincre, il suffit de parcourir le volume que M. Saccardo consacre aux Hyphomycètes dans son *Sylloge Fungorum* et les diverses flores mycologiques publiées dans ces dernières années.

Trop rarement, ces prétendues espèces sont soumises à une étude méthodique basée sur le développement des organes reproducteurs. Des travaux de cette nature ont une utilité d'un ordre plus élevé : pour beaucoup de naturalistes, toutes ces

moisissures ne seraient que des états de développement de champignons à structure plus compliquée, qui pour la plupart appartiennent à l'ordre des Ascomycètes, un petit nombre à celui des Basidiomycètes. Cette hypothèse ne peut assurément être confirmée que par de nombreuses cultures expérimentales.

Dans ces études, il importe de ne pas oublier que les milieux liquides ne conviennent guère au plus grand nombre d'Hyphomycètes. Beaucoup n'y développent que des filaments mycéliens sans revêtir l'aspect naturel avec cellules reproductrices. D'autre part, la méthode des cultures dans les liquides se prête assez mal à la séparation des divers types qui peuvent se trouver mélangés sur un même substratum. Des procédés de culture plus parfaits étaient à désirer.

Une nécessité du même ordre s'était révélée dans l'étude des Bactéries ; c'est M. R. Koch qui y répondit par la vulgarisation de la méthode de culture sur milieux solides et particulièrement sur gélatine.

Pendant le mois de décembre 1886, je fus amené à appliquer ce procédé à l'étude du *Cladosporium herbarum*, recueilli sur les matières végétales les plus variées. J'ai fait de ce champignon une étude prolongée, qui m'en a fait connaître le curieux polymorphisme.

Le milieu de culture dont j'ai fait l'emploi le plus fréquent, est le moût de bière additionné de 8 à 10 % de gélatine. Il est excellent pour la croissance d'un très grand nombre de moisissures. Les cultures ont été faites sur verres de montre placés dans des godets en porcelaine disposés en pile. Le procédé est très commode et permet d'observer facilement la croissance des mycéliums sous le microscope.

Tous les résultats consignés dans ce travail ont été contrôlés par la culture en goutte de gélatine nutritive suspendue à la face inférieure d'une lamelle. On peut ainsi suivre d'une manière continue, sous le microscope, le développement d'une même spore, sans crainte d'impuretés causées par les germes de l'atmosphère.

## I

CLADOSPORIUM HERBARUM (*Link.*)

Cette mucédinée est extrêmement commune dans la nature. Elle recouvre de taches foncées, parfois roussâtres, les tiges des plantes mortes; elle est très répandue à l'automne et au printemps. En été, elle abonde également sur les baies, surtout dans les derniers temps de la maturation. Ce sont au début des filaments irréguliers, cloisonnés, qui rampent à la surface des tiges mourantes, et qui parfois pénètrent dans les tissus corticaux. Ça et là il se produit des amas de cellules brunes, d'où s'élèvent bientôt des filaments dressés, terminés par des conidies.

Les productions appliquées sur les écorces se rapportent aux formes décrites par Link sous les noms de *Dematium nigrum* et de *Torula herbarum*. Des masses identiques peuvent cependant appartenir à d'autres champignons. La culture seule peut renseigner exactement sur la nature des mycéliums dématioides qui se rencontrent sur les débris végétaux.

Au sommet des filaments dressés naissent des conidies, à accroissement terminal et qui sont de forme extrêmement variable. Tantôt ce sont des cellules ovoïdes à membrane assez épaisse et brune; ou bien, ces conidies se divisent et deviennent septées, formées de deux à cinq cellules. D'autres restent unicellulaires et conservent leurs parois hyalines; elles ont l'aspect de cellules de Levures, surtout des formes-levures mycodermiques (*Saccharomyces Mycoderma*). Plongées dans une goutte d'eau ou d'alcool, ces conidies se détachent avec la plus grande vivacité et se répandent dans le liquide.

La vigueur des filaments du *Cladosporium* et les dimensions des conidies varient suivant la nature spécifique des plantes hospitalières. Les exemplaires récoltés sur les fruits charnus en décomposition (courges,...) sont beaucoup plus forts que ceux que l'on rencontre sur les tiges sèches. Enfin les divers échantillons placés en chambre humide donnent toujours des filaments plus élevés que ceux qui ont été recueillis en plein air. Ce sont là des variations causées par la différence de milieux nutritifs et qui disparaissent dans les cultures en milieux artificiels. Cependant on peut admettre l'existence de plusieurs races qui semblent se



maintenir dans la suite des générations et qui se caractérisent par l'étendue des mycéliums, le diamètre des filaments et la taille des appareils conidifères. Des variétés de même ordre existent aussi chez d'autres moisissures très communes (*Penicillium glaucum*). Il n'y a certainement pas lieu de les considérer comme espèces.

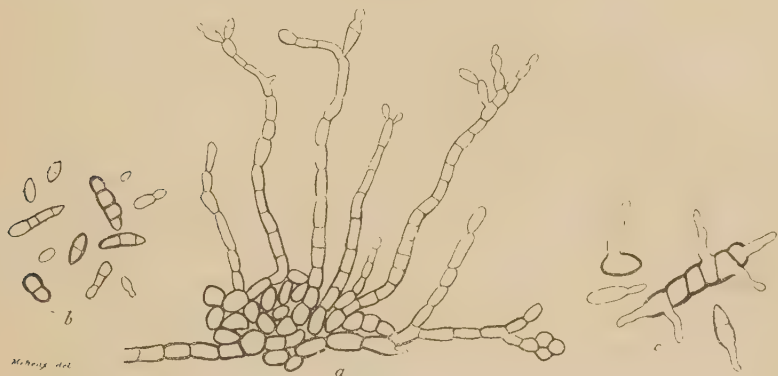


Fig. 1. *Cladosporium herbarum*, récolté sur courge : a, mycélium et filaments conidifères. Gr = 200. — b, Diverses formes de conidies. Gr = 200. — c, conidies en germination. G = 600.

La description que je viens de donner du *Cladosporium herbarum* se rapporte à la forme conidifère. D'après plusieurs botanistes<sup>1</sup>, celle-ci appartiendrait à un Ascomycète, le *Pleospora herbarum*, qui se présente en petites masses noires et globuleuses, sur les tiges mortes des plantes herbacées. De pareils rapprochements, faits sans cultures de vérification, sont toujours sujets à caution. L'identité spécifique du *Cladosporium* et du *Pleospora* a déjà été contestée par Gibelli et Griffini<sup>2</sup>.

Dans mes nombreuses cultures de *Cladosporium*, je n'ai jamais observé la production de périthèces. Ce n'est, toutefois, pas une raison suffisante pour nier l'identité spécifique du *Cladosporium* et du *Pleospora*, car il est permis de supposer que la transformation d'une forme conidifère en forme ascomycète exige des conditions physiologiques particulières.

1. Tulasne, *Selecta Carpologia fung.*, II, p. 261. O. Wunsche, *Flore générale des champignons*, 1883, p. 43.

2. Sul polimorfismo della *Pleospora herbarum* (*Arch. del laborat. di bot. crittog. in Pavia*, I, p. 33, 1875).

J'ai essayé sans plus de succès la transformation inverse par la culture du *Pleospora*.

Si la culture du *Cladosporium* ne m'a pas permis d'observer la production de périthèces, elle m'a révélé la variété remarquable des états conidifères de ce champignon.

Cultivé dans des solutions nutritives, moût de bière, infusion de pruneaux, liquide de touraillons sucré, etc., le *Cladosporium* typique en recouvre la surface d'un feutrage serré, pourvu à la face supérieure d'appareils conidiens de couleur foncée. La couche mycélienne est parfois gaufrée comme celle d'une culture d'*Aspergillus niger* dans le liquide Raulin. Si l'on prend la semence sur une écorce exposée à l'air, il arrive, mais rarement, que la culture s'arrête à l'état mycélien. On obtient ainsi des aspects *dematium* qui, en vieillissant, brunissent et forment des croûtes noirâtres analogues à l'état *fumago* que l'on rencontre sur les feuilles.

Lorsque la végétation du *Cladosporium* est dématioïde, il y a production dans le liquide de cellules isolées ou groupées en très petit nombre, absolument comparables à celle des Levures. Je les désignerai sous le nom de cellules formes-levures de *Cladosporium*. M. Cuboni, qui les a observées, les appelait cellules *saccharomycétiformes*<sup>1</sup>. J'aurai l'occasion de parler de cette forme-levure.

Le *Cladosporium* croît assez bien dans le liquide Raulin sans présenter de caractère particulier.

En somme, la culture du *Cladosporium herbarum* sur milieux liquides, reproduit l'aspect typique; de plus, elle présente parfois à l'intérieur du liquide des filaments sans conidies aériennes, mais pourvus de conidies aquatiques qui ont la forme des cellules de Levures. J'emploie ici le mot aquatique pour caractériser ces productions cellulaires, car, à mon avis, elles correspondent exactement aux conidies portées par les filaments aériens.

Si, aux milieux liquides, on substitue la gélatine nutritive, le développement du *Cladosporium* devient bien plus intéressant à observer.

Quand les conidies semées proviennent d'une forme typique, c'est-à-dire non dématioïde, on voit les filaments mycéliens envahir la gélatine, puis atteindre la surface, se dresser dans

1. Cuboni, *Sulla probabile origine dei Saccaromicete*, 1883.

l'air et se terminer par des appareils conidifères beaucoup plus compliqués que ceux du *Cladosporium* observé sur débris végétaux ou à la surface des liquides nutritifs. Ce sont de petites cimes arborescentes, à rameaux nombreux, dont les cellules diminuent progressivement de taille vers l'extrémité de chaque ramification. La croissance est terminale comme chez le *Cladosporium*; les cellules du sommet sont donc celles qui ont été produites en dernier lieu. Au contraire, chez le *Penicillium glaucum*, l'accroissement se fait à la base des chapelets de conidies.

La forme conidienne que présente le *Cladosporium* cultivé sur gélatine nutritive est connue des mycologues sous le nom de *Penicillium cladosporioides* Frésénius.

Pour l'obtenir à l'état le plus parfait, il ne faut semer sur gélatine riche en matières sucrées qu'un nombre modéré de conidies, de manière à assurer à chaque mycélium une abondante alimentation. Vues au microscope, à un faible grossissement, l'aspect des taches mycéliennes recouvertes de leurs appareils conidifères est vraiment admirable. Lorsque de nombreux mycéliums se pressent sur un petit espace, les filaments conidifères restent beaucoup plus maigres et ne diffèrent pas de ceux du *Cladosporium* récoltés sur tiges mortes.

## II

### PENICILLIUM CLADOSPORIOIDES (*Fresenius*<sup>1</sup>).

Synonymes: *P. olivaceum* Corda; *P. nigrovirens* Frésénius; *P. viride* Frésénius; *P. chlorinum* Frésénius; *Hormodendron cladosporioides* Saccardo.

Il est caractérisé par des filaments dressés, cloisonnés, terminés par des appareils conidifères formés de rameaux disposés en grappes plus ou moins ramifiées, portant des conidies ovoïdes en chapelets, unicellulaires ou pluricellulaires, olivacées ou fauves.

Au contact de l'eau, les conidies se détachent de leur support avec la plus grande facilité; il est presque impossible d'en faire de belles préparations microscopiques.

L'étude du *Pen. cladosporioides* a été entreprise par E. Lœw<sup>2</sup>.

1. G. Frésénius, *Beiträge zur Mykologie*, 1830, p. 22.

2. E. Lœw, Zur Entwicklungsgeschichte von *Penicillium*, in *Jahrbucher für wissensch. Botanik*, t. VII, p. 472, 1870.



Comme G. Frésénus, Lœw admet la distinction de ce champignon, mais identifie *P. viride*, *P. nigrovirens*, *P. chlorinum* de Frésénus et le *P. olivaceum* de Corda avec le *P. cladosporioides*. Ces formes diffèrent par le diamètre et la couleur de leurs filaments conidifères, ainsi que j'ai pu le constater fréquemment dans la suite de ces recherches. Une forme naine, grêle dans tous ses organes, est surtout commune sur la plupart des fruits sucrés arrivés à maturité.

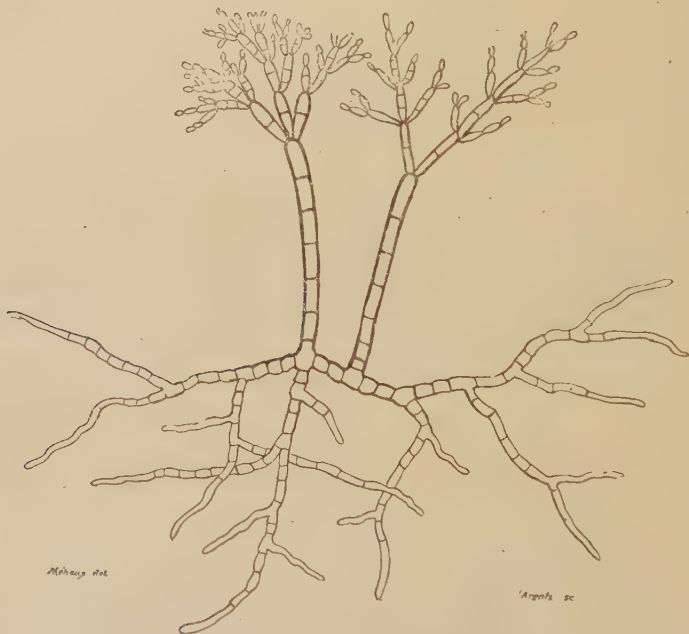


Fig. 2. *Penicillium cladosporioides*, cultivé sur gélatine. G = 80.

Les diverses variétés de *Pen. Cladosporioides* correspondent aux races de *Cladosporium herbarum* dont j'ai déjà fait mention. J'aurai l'occasion d'indiquer des variations de même nature dans la forme *dematium* et la forme-levure qui dérivent du *Cladosporium*.

La mucédinée décrite par Frésénus n'est un vrai *Penicillium* que par la disposition en pinceau plus ou moins parfait de ses rameaux conidifères. Elle se distingue du *Pen. glaucum* par la croissance terminale de ces derniers, ainsi que je l'ai déjà fait remarquer. Pour ce motif on devrait abandonner ici le nom générique de *Penicillium*. Je ne le fais pas, parce que j'estime

que pour les Hyphomycètes, la valeur des noms génériques est trop relative pour avoir la même importance que dans la classification des animaux et des végétaux supérieurs. Pour moi le nom de *Pen. cladosporioides* désigne simplement et d'une façon commode un état conidifère du *Cladosporium herbarum*.



Fig. 3. *Penicillium cladosporioides*, variété à filaments mycéliens étroits et à filaments conidifères très courts. G = 80.

Malgré l'extrême dispersion des spores de ce champignon, la forme *Penicillium* est très rarement citée dans les flores cryptogamiques. Dans ses études sur les germes de l'air, M. E. Hansen a observé le *Pen. cladosporioides* à plusieurs reprises<sup>1</sup>. Avant d'entreprendre le présent travail, je l'avais trouvé sur une solution de dextrine très concentrée, et sur ce milieu j'avais pu constater toutes les transitions entre la forme *Cladosporium* à conidies peu abondantes et la forme *Penicillium* à conidies nombreuses. Il n'y a là qu'une question de nutrition plus ou moins favorable à une végétation vigoureuse. Les milieux sur lesquels le *Cladosporium* développe son mycélium, sont ordinairement trop pauvres pour produire du *Pen. cladosporioides*.

Lorsque la gélatine qui sert à la culture se dessèche fortement, les filaments mycéliens qui y sont plongés concentrent çà et là leur protoplasme. Les masses ovoïdes ainsi formées semblent constituer des chlamydospores, analogues à celles de plusieurs Mucorinées.

Ensemencé dans des tubes de gélatine par piqure avec un fil de platine, le *Pen. cladosporioides* se développe exclusivement dans

1. Compte rendu du Labor. de Carlsberg, 1879, p. 59 et 66.

la portion superficielle. Il n'est nullement anaérobie. J'insiste sur ce point, car d'autres formes conidiennes de *Cladosporium*, que je décrirai plus loin, peuvent se développer dans la profondeur des liquides.

La transformation du *Cladosporium* en *Pen. cladosporioides* est aisée à réaliser sur gélatine. Le contraire est-il possible? Peut-on avec des conidies de ce dernier revenir à la forme normale des tiges mortes? Ce n'est pas difficile, pourvu que l'on emploie des milieux nutritifs appropriés. J'ai bien réussi sur empois d'amidon et surtout sur des morceaux de courge et de tiges de topinambour qui avaient été stérilisés par la vapeur d'eau et placés ensuite en chambre humide. J'ai obtenu des productions identiques à celles du *Cladosporium* placé dans les mêmes conditions.

La même transformation est aussi facile à réaliser par la culture du *Pen. cladosporioides* sur morceaux d'aubier de peuplier abattu au mois de juin et gorgé de matières sucrées. Enfin M. Massart est arrivé au même résultat par l'emploi d'une gélatine nutritive additionnée de 60 à 70 0/0 de saccharose, de 20 0/0 de glycérine, de 10 0/0 de chlorure de sodium ou de 20 0/0 de nitrate de potassium. A pareille concentration, ces substances sont nuisibles à l'assimilation par leur action osmotique considérable.

Il n'y a donc aucun doute : le *Penicillium cladosporioides* est une forme bien nourrie, très vigoureuse du *Cladosporium herbarum*. Mais le sujet n'est pas épuisé, et nous y reviendrons dans un prochain article.

---



## DE L'ABSENCE DES MICROBES DANS LES TISSUS VÉGÉTAUX

Par M. A. FERNBACH, préparateur à la Sorbonne.

---

Depuis les expériences classiques dans lesquelles M. Pasteur a montré que du jus de raisin reste inaltéré, si on prend la précaution de l'emprunter soit à l'intérieur des grains, soit à des grappes ayant mûri dans des enveloppes de coton, à l'abri des germes de l'air, on admet, par suite d'une tendance naturelle de l'esprit qui nous porte à généraliser, que l'organisme des végétaux est, comme celui des animaux, normalement fermé à la pénétration des microbes.

Une expérimentation plus étendue sur ce sujet paraissait cependant utile, surtout après la publication de quelques Mémoires dont les conclusions, établies pour d'autres végétaux et dans des conditions différentes de celles de M. Pasteur, étaient en contradiction avec l'opinion la plus généralement adoptée.

Ainsi, M. A. Jorissen (*Acad. royale de Belgique*, 1884) a attribué à la présence de bactéries dans les tissus végétaux la production de la diastase. Ses affirmations ont été contredites par M. E. Laurent (*ibid.*, 1885), qui, opérant sur des graines et des tubercules en germination, c'est-à-dire à l'époque où la production de diastase est la plus active, n'a réussi, ni par la coloration, ni par l'ensemencement dans la gélatine et dans le jus de pruneaux, à y déceler la présence des microbes.

Le Dr H. Bernheim, de Würzburg, qui n'a pas, sans doute, eu connaissance de ces publications, a signalé récemment, au Congrès de Cologne, dans les céréales, les fruits à gousse et les tubercules, la présence de microbes qui, selon lui, se multiplieraient abondamment pendant la germination, et auxquels il faudrait attribuer un rôle important dans la production de la diastase. Les expériences de M. Duclaux (*Comptes rendus*, t. C, p. 66) sur la germination dans un milieu stérile, avaient pourtant montré

que les graines ne contiennent pas normalement de microbes et que la germination peut parfaitement se produire sans eux.

M. Galippe, enfin (*Journal des connaissances médicales*, 30 juin 1887), a publié des expériences dans lesquelles, ensemençant dans des milieux de culture plus variés que ne l'avait fait M. Laurent, et sans s'astreindre à opérer sur des plantes en germination, des fragments de végétaux divers, il a observé dans la plupart des cas un développement de microbes. Il en tire la conclusion, passablement en désaccord avec tout ce que l'on savait jusque-là, que les microbes, et en particulier ceux du sol, pénètrent dans les tissus végétaux avec lesquels ils sont en contact.

J'ai repris les expériences de M. Galippe, en me plaçant dans les mêmes conditions que lui, c'est-à-dire en prenant les végétaux tels qu'ils arrivent sur le marché, sans m'astreindre à expérimenter sur des légumes cultivés à Gennevilliers, estimant qu'une terre végétale quelconque est suffisamment riche en microbes divers pour que ceux-ci pénètrent dans les végétaux, si leur pénétration était physiologiquement possible. J'ai cru aussi devoir m'en tenir à quelques espèces végétales, pomme de terre, carotte, navet, betterave, tomate, jugeant inutile de prolonger outre mesure des expériences qui jusqu'ici disent toutes que les conclusions de M. Galippe sont erronées.

Les milieux de culture que j'ai employés, renfermés soit dans des tubes à essai, soit dans des matras Pasteur, sont le bouillon de veau neutre et l'eau de navets sucrée, milieu qui, naturellement, est très légèrement acide.

Voici le procédé dont je me suis servi pour faire les ensemencements. Dans tous les cas, la portion de surface du végétal par laquelle devait passer l'instrument destiné à faire la prise d'essai était chauffée jusqu'à carbonisation légère par l'application d'un thermo-cautère dont l'extrémité rougie était formée par un large bouton légèrement convexe. Pour la tomate, j'aspirais la pulpe avec une pipette à coton dont la portion étirée avait 2 à 3 millimètres de diamètre; j'obtenais ainsi 3 ou 4<sup>cc</sup> de pulpe que je répartissais entre deux matras Pasteur, renfermant chacun l'un des milieux de culture indiqués plus haut. Pour les autres végétaux, j'ai employé, comme l'avait fait M. Laurent, des emporte-pièce en laiton, qui servent généralement à percer les bouchons.

Ces tubes, munis à leur extrémité non tranchante d'un tampon de coton, et renfermés dans des tubes à essai bouchés avec de la ouate, étaient préalablement chauffés à 165°. J'obtenais avec ces tubes des cylindres de tissu végétal que je poussais peu à peu au dehors, et que j'enseménçais au moment de leur sortie en les sectionnant avec un scalpel flambé. J'introduisais ainsi dans chaque tube à essai un volume de tissu végétal variant entre 0<sup>cc</sup>,5 et 1<sup>cc</sup>.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus.

	Nombre de végétaux étudiés.	Nombre d'ensemencements.	Nombre d'ensemencements féconds.
Tomates	26	52	2
Navets	36	199	19
Carottes	13	101	4
Betteraves	12	103	10
Pommes de terre	11	100	0
	98	555	35

On voit qu'il y a un certain nombre d'ensemencements féconds, 6,3 0/0. Il ne saurait guère en être autrement. Il y a, en effet, dans des expériences aussi délicates, un certain nombre de causes d'erreur auxquelles il est impossible de se soustraire d'une façon absolue. La plus importante est celle qui provient des germes de l'air, toujours abondants, bien qu'en nombre très variable, dans un laboratoire où il y a des allées et venues et où l'on est constamment exposé aux courants d'air; la pratique presque quotidienne du remplissage des matras Pasteur m'a montré que, dans le laboratoire où j'ai fait mes expériences, sur 100 matras remplis, il y en a toujours 4 ou 5 qui se peuplent. C'est là un chiffre qui, lorsqu'on ne prend pas de précautions spéciales, doit être considéré comme un minimum pour des expériences qui exigent, comme celles qui viennent d'être décrites, l'emploi d'un certain nombre d'instruments et une manipulation assez longue. D'ailleurs, l'examen microscopique des tubes féconds confirme cette manière d'interpréter les succès de quelques-uns de mes ensemencements : les êtres développés sont multiples, bacilles, micrococcus, moisissures, et en général, dans chaque tube peuplé, on ne trouve qu'une seule espèce. Comment expliquerait-on cette variété d'êtres, cette séparation des espèces,



ainsi que la répartition très inégale des germes, si l'on n'admettait qu'ils proviennent de l'extérieur du végétal, et non de ses tissus intérieurs?

Une autre cause d'erreur, plus facile à éviter, mais que j'ai cependant rencontrée plusieurs fois, est celle qui provient de la pénétration de germes dans l'intérieur du végétal à la suite d'un insecte; dans ce cas, la majeure partie des tubesensemencés se trouble, chaque tube peuplé présente toujours plusieurs espèces et on aperçoit en y regardant de près, le tunnel parfois très étroit, creusé par l'insecte.

On comprendra que, pour être bref, je n'aie pas indiqué mes expériences par le menu. Je signalerai seulement un fait général qui confirme encore les considérations qui précèdent. Chaque fois que j'aiensemencé un certain nombre de tubes, c'est toujours dans la première moitié que j'ai eu à noter le plus grand nombre d'insuccès, parce qu'on devient d'autant plus habile à faire une opération délicate qu'on l'a déjà faite plus souvent. M. Laurent avait déjà trouvé le même fait et l'avait expliqué de même. De plus, et pour la même raison, à mesure que j'ai poursuivi mes expériences, le nombre des insuccès a été constamment en diminuant, et je ne doute pas que si j'en recommençais une nouvelle série, j'arriverais à abaisser beaucoup la proportion des ensemencements féconds.

Concluons donc que les tissus végétaux normaux constituent pour les microbes un filtre parfait, et qu'ils ne peuvent être envahis par eux qu'à la suite de causes tout à fait accidentelles.

---

## REVUES ET ANALYSES

---

L. MANFREDI ET G. TRAVERSA. Sur l'action physiologique et toxique des produits de culture du streptococcus de l'Erysipèle. *Gior. internaz. d. Sc. Mediche*, X<sup>e</sup> année, 1888.

Depuis le jour où M. Pasteur a montré que l'inoculation d'une culture stérilisée du microbe du choléra des poules amenait une maladie passagère, dont les symptômes étaient pourtant à peu près identiques à ceux de la maladie mortelle produite par l'inoculation du microbe lui-même, l'attention est restée fixée sur le rôle pathologique des substances solubles que les microbes laissent dans leur milieu de culture, à l'état de sécrétions ou de produits d'excrétion. On a surtout relevé ce rôle dans certaines maladies dont la marche et le facies général réveillaient le plus l'idée d'une intoxication, le tétanos traumatique, le choléra, le typhus, et, à un degré plus éloigné, le charbon et l'infection généralisée produite par le vibron septique.

Par une pente toute naturelle de l'esprit, on s'est demandé aussi si ces substances, dont l'introduction dans l'organisme produisait des désordres de même nature que l'invasion du microbe qui les produisait, n'étaient pas aussi des substances vaccinales, et on sait combien il s'est déjà accumulé dans cette voie de faits et d'espérances.

Deux moyens se présentent pour débrouiller cette question et toutes celles où entrent en jeu les produits de la vie des microbes. On peut ou bien essayer de séparer par l'analyse chimique le mélange, en général assez complexe, des substances diverses que contiennent les tissus morbides ou les liquides de culture, et c'est ainsi que Brieger a retiré la *typhotoxine* des cultures du bacille du typhus, et la *tétanine* des cultures du bacille du tétanos; ou bien encore avoir recours pour cette séparation à l'analyse physiologique. Le nombre des toxiques dont l'action sur les divers tissus a été bien étudiée est en ce moment assez grand, et les réactifs, représentés par l'arsenal instrumental de la physiologie moderne, sont assez délicats pour qu'on puisse en espérer du secours, lorsque l'analyse chimique est impuissante, et leur demander, sinon le nom, du moins la famille des produits toxiques microbiens dont on cherche la nature. En usant de ces deux méthodes, en les combinant au besoin, on confondrait dans une voie unique les deux voies, plus divergentes en apparence qu'en réalité, qui aboutissent aux deux grands noms de Cl. Bernard et de Pasteur, et on ferait sûrement, de belles découvertes.

MM. Manfredi et Traversa, dont le travail nous inspire ces réflexions ont eu le mérite d'aborder des premiers, sinon les premiers, une face inté-

ressante du problème que nous venons de poser. Ils ont étudié soigneusement au point de vue physiologique le mécanisme de l'action des cultures stérilisées du microbe de l'érysipèle. Ils ont choisi cette maladie, d'abord parce qu'elle s'accompagne d'ordinaire d'un procès évident d'intoxication, et ensuite parce que Brieger avait échoué dans ses recherches d'une ptomaine spéciale au microbe de cette affection. L'analyse chimique étant impuissante, c'était une bonne occasion pour l'analyse physiologique d'essayer ses forces.

La première condition était de choisir un bon terrain de recherches et de le bien définir. Le peu qu'on sait en effet sur les substances, toxiques ou autres, laissées par les microbes dans les milieux de culture, c'est que leur nature dépend de la nature du milieu, et que dans un même milieu, elles ne sont pas toujours en même quantité. Leur nature et leur proportion dépendent de l'âge de la culture, de la température, de la présence ou de l'absence de l'oxygène, etc. Toutes les cultures de MM. Manfredi et Traversa ont été faites dans du bouillon de bœuf peptonisé et neutralisé suivant les préceptes de Koch, et maintenu à 25°-30°. On le stérilisait par filtration, et on l'inoculait à des grenouilles, à des cobayes et à des lapins.

D'une manière générale, on peut dire que les désordres nerveux qui suivent l'injection d'une certaine quantité de ce liquide de culture se rapportent à deux formes cliniques bien déterminées, la première caractérisée essentiellement par des phénomènes de paralysie, la seconde par des symptômes convulsifs plus ou moins diffus dans les divers organes.

Notons tout de suite que cette différence dans la manifestation des symptômes toxiques n'a aucun rapport avec l'âge ou la quantité de la culture employée. La même culture peut, à la même dose, produire des effets essentiellement différents dans des animaux de la même espèce. « Avec une culture filtrée au 16<sup>e</sup> jour, par exemple, nous avons obtenu la forme convulsive chez des cobayes et des grenouilles, et la forme paralytique chez les lapins. Une seconde culture de 16 jours, préparée dans des conditions identiques, a donné chez les grenouilles et les lapins la forme essentiellement paralytique, et chez les cobayes la forme convulsive associée à un léger degré de parésie des membres. Enfin, avec une culture du 8<sup>e</sup> jour, faite dans le vide, nous avons eu chez certaines grenouilles la forme convulsive, chez d'autres la forme paralytique. »

Ceci témoigne que l'étude est difficile, puisque le réactif n'est pas sûr, et traduit par des phénomènes différents l'inoculation de la même substance. Le mode d'introduction a peut-être de l'importance, peut-être aussi des dispositions particulières de l'animal qui font que tel de ses départements est plus ou moins rapidement atteint. Le fait est à rapprocher des résultats de M. Helman (V. ce volume, p. 273) qui, avec le même virus rabique, obtient tantôt la forme furieuse, tantôt la forme paralytique.

MM. Manfredi et Traversa ont surtout rencontré la forme paralytique avec les grenouilles et les lapins. A la suite de l'injection de 1 à 3 centimètres cubes de liquide de culture, la grenouille tombe dans une torpeur qui passe progressivement au coma. Cet état de dépression des forces nerveuses persiste de 20 minutes à cinq heures; il est suivi d'une parésie des mem-

bres postérieurs, qui s'étend bientôt au train de devant, en détruisant les mouvements volontaires, mais en laissant encore intacte l'excitabilité réflexe, qui finit pourtant par s'éteindre à son tour. La respiration est arrêtée, et on pourrait croire la grenouille morte, si, en découvrant son cœur, on ne le voyait encore battre avec un rythme un peu ralenti, mais avec une énergie suffisante.

En l'absence de troubles circulatoires, il faut donc admettre une action toxique sur l'appareil nerveux central ou périphérique ou encore sur les muscles. Une expérience bien simple permet de préciser. Si, immédiatement après la perte totale du mouvement, on met à nu le nerf sciatique et le gastro-cnémien correspondant, on trouve que nerf et muscle sont encore très sensibles à l'action électro-faradique. La paralysie doit donc être d'origine centrale. Toutefois, tout en maintenant que les nerfs et les muscles ne concourent pas à la genèse de la paralysie, les auteurs ne veulent pas rejeter à priori toute action des produits de culture sur ces organes, qui perdent aussi rapidement leurs propriétés physiologiques. Ainsi, à une période plus avancée de l'intoxication, c'est-à-dire de 15 à 40 minutes depuis le commencement de la paralysie, on constate que le nerf sciatique perd d'abord son excitabilité, puis le muscle son irritabilité. Mais il n'en est pas moins démontré que, dans ses traits généraux, l'intoxication frappe d'abord le cerveau et le bulbe, d'où le coma, la perte des mouvements volontaires et l'arrêt de la respiration. Puis elle s'étend à la moelle épinière, d'où l'arrêt des mouvements réflexes.

Chez les lapins, le cadre est moins complet et se borne d'ordinaire aux phénomènes bulbaires. Le cobaye est plus sujet à présenter la forme convulsive.

C'est encore la grenouille qui offre le type le plus complet de cette seconde forme de l'intoxication. Trois ou cinq minutes après l'injection, sous la peau ou dans le péritoine, de 1 à 2 centimètres cubes de culture âgée de 10 à 16 jours, ou d'une culture de 8 jours dans le vide, on voit apparaître une période de torpeur générale à laquelle succèdent bientôt des contractions spasmodiques cloniques qui, débutant par les muscles de la tête et des membres supérieurs, s'étendent d'une manière inégale et irrégulière sur les autres parties du corps. Elles deviennent peu à peu toniques au point de ressembler aux crises convulsives de la strychnine. D'autres fois, les symptômes d'irritation motrice se traduisent par des convulsions épileptiformes ou un spasme tétanique.

« Quelle que soit la forme, du reste très variable, des convulsions spasmodiques, elles diminuent graduellement d'intensité et d'étendue, 20 à 45 minutes après leur apparition, et reprennent le caractère clonique. Elles cessent au bout de 1 à 2 heures. Il reste alors une paralysie générale des membres, si bien que les grenouilles semblent mortes. Si on leur met le cœur à nu, on le trouve battant plus ou moins vivement, mais avec un certain ralentissement. A cette période de mort apparente succède la mort réelle, ou le retour à l'état normal. »

Dans ce dernier cas, le rétablissement diffère de celui qu'on observe dans les cas d'intoxication par la strychnine en ce qu'il n'est pas précédé ici d'une



nouvelle et longue phase d'attaques convulsives. Il ressemble au contraire beaucoup à celui qu'on observe dans les cas d'empoisonnement avec la picrotoxine.

Pendant la durée des crises, les nerfs moteurs et les muscles restent excitables comme dans la forme paralytique. Dans la phase terminale, les nerfs peuvent perdre leur excitabilité, alors que les muscles sont encore contractiles. Ils meurent à leur tour, s'il y a mort de l'animal, mais quand il revient à la vie, les nerfs reprennent leur activité normale.

Chez le cobaye, après injection hypodermique ou intrapéritonéale de 5 à 15<sup>cc</sup> de culture filtrée, on voit apparaître d'abord la torpeur, puis des convulsions violentes dans diverses régions du corps. Ces convulsions qui ont d'abord le caractère clonique, se généralisent et prennent la forme de paroxysmes durant lesquelles l'animal exécute de droite à gauche un mouvement de manège autour de son train postérieur. Bientôt il s'arrête par abolition des mouvements volontaires, et les contractions cloniques continuent, coupées parfois par des accès spasmodiques pendant lesquels les mouvements de manège reprennent. La respiration est manifestement troublée, et le cœur bat plus lentement qu'à l'ordinaire. Dans cette forme comme dans la forme paralytique, cet organe est à peine atteint et est le dernier à mourir.

Deux heures après l'injection, les mouvements volontaires commencent à reparaitre, les spasmes cloniques deviennent plus rares, l'animal se relève et revient à la santé après une période de 3 à 4 heures.

Par quel mécanisme se produit cette excitation de l'appareil moteur dans la forme convulsive? Est-ce par suite d'une exagération dans la sensibilité de l'appareil moteur périphérique ou dans l'action du système central? Pour répondre à cette demande, il suffit de comparer deux grenouilles, l'une à qui l'on a coupé le tronc du nerf sciatique en laissant la circulation se faire dans le membre correspondant, l'autre dans laquelle on a lié l'artère iliaque ou l'un des membres inférieurs en totalité, à l'exception du nerf sciatique correspondant. On voit que dans la première, il y a des contractions spasmodiques partout, sauf dans le membre dont le nerf est sectionné et qui reste parfaitement immobile. Dans les grenouilles dont l'un des membres ne reçoit plus de sang, mais a conservé ses attaches nerveuses, les phénomènes convulsifs apparaissent comme si ce membre était intact. Les crises convulsives sont dues à une influence sur l'appareil moteur central. Pour localiser davantage le centre d'action. MM. Manfredi et Traversa ont coupé sur des grenouilles la moelle épinière dans la région dorsale au dessous de l'origine apparente des nerfs brachiaux, et ont alors pratiqué dans le ventre ou sur les membres postérieurs l'inoculation du bouillon de culture. Les phénomènes convulsifs se sont alors manifestés, avec leur physionomie caractéristique, dans la partie antérieure du tronc, et ont manqué dans la partie privée de ses communications nerveuses. Ils sont donc dus à une action sur les centres encéphalo-bulbaires. C'est une nouvelle différence avec les effets de la strychnine, qui attaque surtout la moelle épinière.

Enfin, en voyant que l'ablation des hémisphères cérébraux, faite avant

l'injection, n'empêche nullement l'apparition des symptômes convulsifs, qu'il en est de même après la destruction des lobes optiques, des pédoncules, du cervelet, tandis que les convulsions cessent complètement au moment où on détruit le bulbe, on est conduit à penser que c'est sur cet organe qu'agissent surtout, au moins chez les grenouilles, les produits toxiques sécrétés par le microbe de l'érysipèle.

Quels sont maintenant les rapports entre les caractères cliniques de l'érysipèle et les phénomènes d'intoxication que nous venons de décrire? A côté des lésions locales de la maladie, lésions aujourd'hui bien connues au double point de vue clinique et bactériologique, il y a des phénomènes généraux, fièvre, troubles nerveux sensoriels (céphalée, coma) des troubles d'excitation motrice (sursauts tendineux, contractures, contractions cloniques et toniques), il y a même quelquefois du délire, tous phénomènes qui se retrouvent dans les cas d'intoxication, et dont l'origine doit dès lors être recherchée, non dans les complications morbides que l'on accusait naguère, mais dans l'absorption continue des produits de la culture des microbes. Telle est au moins la thèse soutenue par MM. Manfredi et Traversa, et qu'ils s'appliquent à justifier par des considérations diverses et par des analogies parmi lesquelles nous ne choisirons que celles qui ont une base expérimentale, et qui ajoutent quelques faits, bons à connaître, à ceux que nous connaissons déjà.

C'est ainsi que le degré de toxicité d'une culture dépend moins de son âge, dont l'influence, comme nous l'avons vu, est variable et médiocre, que de sa fécondité. En d'autres termes, ces substances produites par le microbe dépendent plus du nombre de microbes développés dans le liquide de culture que du séjour qu'ils y ont fait. Toutes choses égales d'ailleurs, il y en a plus à 28°-30° qu'à 37°, parce que cette température commence à être défavorable au coccus de l'érysipèle. On s'explique ainsi que cliniquement, les formes les plus graves de l'érysipèle ne sont pas celles qui durent longtemps avec des foyers circonscrits, mais celles qui présentent une large surface d'invasion, comme par exemple les érysipèles traumatiques.

La non accumulation des produits toxiques dans les cultures est sans doute liée à leur facile oxydation. On les voit en effet disparaître assez rapidement à l'air, et nous savons aussi que les cultures faites dans le vide ont en moyenne une activité plus grande que les autres. Peut-être cet excès de virulence tient-il en partie à ce que les cultures du microbe sont toujours plus abondantes dans le vide qu'en contact de l'air. Quoi qu'il en soit, le poison de l'érysipèle est instable et on comprend alors que les cas les plus graves d'érysipèle guérissent presque aussi vite que les cas les plus bénins.

On pourrait relever d'autres analogies : celles qui précèdent suffisent. Aussi bien les autres deviennent-elles de plus en plus flottantes, et n'ajouteraient rien à l'intérêt véritable que doit exciter le mémoire que nous venons d'analyser.

Dx.

D<sup>r</sup> F. M. FINKELSTEIN. Expériences sur la rage, faites au laboratoire, d'hygiène de Tiflis. (*Comptes Rendus de la Société Impériale de Médecine du Caucase*, n° 4, 1887.)

Les expériences très nombreuses faites au laboratoire de Tiflis ont confirmé, une fois de plus, les travaux de M. Pasteur sur la rage.

Les résultats obtenus par l'auteur sont résumés dans les lignes suivantes :

Le virus employé venait du laboratoire de M. Pasteur; on a reconnu qu'il se comportait, sur les chiens et les lapins, absolument comme M. Pasteur l'a annoncé, soit que l'on se serve de moelles fraîches ou de moelles desséchées, soit que l'on emploie des moelles conservées à l'air ou dans l'acide carbonique.

Avec le virus fixe, la durée de l'incubation et celle de la maladie étaient très régulières. (7 jours d'incubation; 3 à 4 jours de maladie.)

A Tiflis, on s'est appliqué à suivre très exactement la température des animaux en expérience et on y a constaté, pour la première fois, que le 4<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour après l'inoculation par trépanation, la température des animaux augmentait. Après l'inoculation sous-cutanée, on a aussi observé une élévation de température qui précède de quelques jours la rage confirmée, ce qui prouve que la durée de l'incubation est plus courte et que la durée de la maladie est plus longue qu'on ne le croit ordinairement. Cet accroissement de la température est un signe très sûr du début de la maladie.

Dans le cours de ses expériences, M. Finkelstein n'a jamais observé les retours aux longues incubations, signalés à tort par M. Frisch. Une plus longue durée de l'incubation tient à ce que l'on a inoculé une très petite quantité de virus.

M. Finkelstein a reconnu, comme M. Pasteur, que l'immunité pouvait être donnée aux chiens à la suite d'une seule inoculation sous-cutanée de virus fixe.

Les lapins sont rendus difficilement réfractaires à la rage; les inoculations préventives, sous-cutanées, peuvent donner la rage à ces animaux.

Dans deux cas, l'injection intra-veineuse de virus fixe n'a été suivie d'aucun effet. Ce mode d'inoculation n'est pas aussi sûr que celui par trépanation.

Les inoculations de virus fixe ont toujours donné la rage paralytique.

A Tiflis, les animaux inoculés préventivement ont toujours été éprouvés par l'inoculation du virus fixe sous la dure-mère. Cette épreuve est plus sévère que celles où l'on fait usage du virus de rage des rues.

L'injection intra-veineuse du virus fixe n'a pas toujours donné la rage aux chiens; l'auteur pense que ce résultat n'est pas complètement d'accord avec ceux du laboratoire de M. Pasteur. Il faut cependant observer que les résultats publiés par M. Pasteur avaient été obtenus avec un virus de passages beaucoup moins élevés que ceux dont M. Finkelstein a fait usage. C'est probablement à cette circonstance qu'il faut rapporter cette différence.

L'inoculation sous la dure-mère des moelles de 3, 4 et 6 jours n'a pas été suivie de maladie, dans trois cas. M. Finkelstein pense que cela est dû



à l'action sur les moelles de la température, qui était alors très élevée à Tiflis. Dans quelques autres cas, l'inoculation intra-arachnoidienne du virus fixe a donné la rage avec un retard qu'il n'a pas été possible d'expliquer.

Les expériences sur l'immunité contre la rage ont porté sur les chiens et les lapins. Deux chiens ont été rendus réfractaires à la suite d'une seule injection de virus fixe sous la peau. Sur 4 chiens, soumis aux inoculations préventives, un seul a résisté à l'inoculation du virus fixe sous la dure-mère. L'auteur pense que les succès auraient été plus nombreux s'il avait multiplié les inoculations préventives; il n'en avait fait que dix.

Les lapins, qui ont servi aux essais de vaccination, ont succombé les uns à la suite des inoculations préventives (8, 14, 16 injections de moelles de 5, 14 et 15 jours). Les autres ont supporté ces inoculations, mais ont pris la rage après injection de virus fixe sous la dure-mère. Cependant, sur 11 expériences, 3 lapins étaient réfractaires après les inoculations préventives. Deux lapins inoculés sous la dure-mère et traités ensuite ont succombé à la rage. Ces résultats sont intéressants à cause de la grande réceptivité du lapin pour la rage et aussi parce qu'ils ont été éprouvés d'une façon très sévère par l'introduction à la surface du cerveau du virus de passage, plus actif que celui de la rage des rues.

Les moelles rabiques employées dans ces expériences ont étéensemencées dans divers milieux nutritifs et toujours sans donner de culture; elles ne contenaient donc pas de microbes étrangers, ce qui prouve le soin apporté par l'auteur dans ces recherches.

BARTOCHEVITCH.

---

H. BUCHNER. Sur les prétendues spores du bacille typhique. *Centralbl. f. Bakt.*, t. IV, p. 353.

L'existence de spores dans le bacille typhique, annoncée par Gaffky, avait, croyons-nous, laissé un peu incrédules tous les savants qui avaient fait des cultures de ce microbe. On y trouve, en effet, au bout de trois ou quatre jours, lorsqu'on le cultive sur la pomme de terre à 37°, des corpuscules ronds et brillants, toujours placés à une extrémité du bacille, mais qui paraissent enchatonnés dans cette extrémité, et dont l'aspect, légèrement rugueux, n'est pas celui des spores des autres bacilles. Gaffky avait argué, pour leur attribuer cette nature, de l'existence, dans les préparations colorées, de plages se refusant à la coloration et placées à l'extrémité des bâtonnets, comme les granules brillants dans la préparation fraîche. Il avait cité, comme seconde preuve de ce qu'il avançait, une expérience dans laquelle il avait vu une culture riche en spores résister trois mois à la dessiccation, mais il n'avait pas fait d'expérience comparative, ni démontré qu'une culture sans spores, mise dans les mêmes conditions, est morte au bout de ce temps. Sur l'existence de ces spores, on avait échafaudé une érie de conclusions étiologiques au sujet de la fièvre typhoïde.



M. Buchner vient donc fort à propos démontrer que les conclusions un peu hâtives de M. Gaffky sont erronées. Les granulations brillantes de l'une des extrémités sont des concrétions protoplasmiques, qui ne se produisent que parce que la culture sur la pomme de terre devient peu à peu acide. Si on rend cette pomme de terre alcaline en la laissant séjourner, avant la stérilisation, quelques minutes dans une solution de soude, on ne trouve plus trace de ces grains brillants. Un autre moyen de les obtenir est de réduire ou de supprimer la quantité d'oxygène dont la culture a besoin. M. Birsch-Hirschfeld a montré de son côté qu'on en trouve dans les bacilles cultivés en présence de matières colorantes qui les pénètrent, par exemple dans une culture en gouttes pendantes sur de la gélatine colorée avec du rouge de phloxine. M. Birsch-Hirschfeld avait interprété le phénomène dans le sens de M. Gaffky, en y voyant la formation de spores. M. Buchner, rapprochant tous ces faits, y voit, avec plus juste raison, un procès de dégénérescence, sous l'influence de la présence de l'acide, de la matière colorante, ou de la privation d'oxygène, procès qui se dénoue comme il le fait presque toujours, par une coagulation du protoplasma.

Restent à expliquer les plages incolores des extrémités dans les préparations colorées. M. Gaffky, les trouvant à la même place que les spores, avait conclu que c'étaient ces spores qui se refusaient à la coloration. M. Buchner montre élégamment que les concrétions protoplasmiques et les plages incolores sont choses très différentes. Il lui suffit pour cela de colorer sa préparation sous le microscope, en faisant arriver doucement la matière colorante sous la lamelle, et d'observer. Il voit alors que la prétendue spore de Gaffky, au lieu de rester incolore, se colore la première, et d'une teinte plus foncée que le reste du bacille. Ce n'est donc pas une spore, ce n'est pas davantage de la matière grasse, c'est du protoplasma condensé. On voit en même temps, à mesure que la coloration du bacille devient plus intense, apparaître, quelquefois à une des ses extrémités, quelquefois aux deux, une plage incolore, due à une rétraction du protoplasma, et qui ne se confond pas avec les prétendues spores, car tantôt ce protoplasma qui se contracte entraîne avec lui le petit coagulum coloré dont nous parlions tout à l'heure, tantôt il le laisse en place. Les plages incolores sont donc dues, d'après M. Buchner, à une simple rétraction du protoplasma, qui se fait surtout pendant la dessiccation de la lamelle dans les méthodes ordinaires de coloration. M. Buchner termine cette démonstration, qui semble topique, en prouvant que les cultures où on trouve de ces prétendues spores, au lieu d'être plus résistantes à la dessiccation que celles où il n'y en a pas, le sont moins, ce qui est d'accord avec l'explication qui voit dans la concrétion protoplasmique une preuve de l'affaiblissement du bacille.

Dx.

V. TASSINARI. Recherches expérimentales sur l'action de la fumée de tabac sur les organismes en général, et surtout sur ceux qui sont pathogènes. *Centralbl.*, t. IV, p. 449.

M. Tassinari fait passer, en l'aspirant, la fumée d'un cigare ou d'une cigarette, dans une chambre formée par deux entonnoirs abouchés, et dans laquelle se trouve suspendue, au moyen d'un fil de platine, une bande de tissu de lin effilochée, et imbibée d'une culture du microbe à étudier. L'expérience terminée, qui dure 30 à 35 minutes et consomme moins de 5 grammes de tabac, on fait tomber le tissu dans un tube à gélatine où on le traite par la méthode ordinaire. On trouve aussi que la fumée de trois espèces de cigares ralentit le développement des microbes, et même arrête tout à fait celui des bacilles du choléra asiatique, de Finkler et Prior, et du typhus abdominal. La fumée de la cigarette ne donne qu'un léger retard, qui est même en moyenne moins prononcé pour les bacilles que tuait la fumée des cigares. Cette contradiction étonne, et on se demande s'il n'y a pas quelque cause d'erreur. Il serait curieux de voir les fumeurs faire de l'hygiène comme M. Jourdain faisait de la prose, sans le savoir. Dx.

---

## INSTITUT PASTEUR

---

### *Personnes traitées mortes de rage.*

COUZINIER (Jean), 63 ans. Courbevoie (Seine). — Mordu par un chien le 12 septembre à l'arcade sourcilière droite : décollement d'un lambeau de peau de 1 centimètre de largeur sur une étendue de 4 centimètres. Deux autres morsures sur le front. Deux éraflures à l'avant-bras gauche et une autre à la jambe droite. Traité du 12 septembre au 3 octobre. Le 6 octobre, Couzinier éprouve des douleurs dans la cicatrice de l'arcade sourcilière. Il se plaint de mal de tête. Le 8, il ressent des fourmillements surtout dans la partie droite de la peau du crâne et de la figure. Il ne dort pas et se plaint de douleurs dans les membres. Le 10, hydrophobie et aérophobie légères qui vont en augmentant le 11 et s'accompagnent d'excitation. Mort le 14 à l'hôpital Broussais.

Le bulbe du chien mordeur a donné la rage en 12 jours aux animaux auxquels il a été inoculé dans l'œil. Couzinier a été pris de rage 3 jours après la fin du traitement.



## INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE <sup>1</sup> DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — SEPTEMBRE 1888

	A		B		C	
Morsures à la tête { simples.....	»	0	»	3	»	1
et à la figure { multiples....	»	1	»	2	»	1
Cautérisations efficaces.....	»	»	»	»	»	»
— inefficaces.....	»	»	»	4	»	»
Pas de cautérisation.....	1	»	»	4	»	2
Morsures aux mains { simples.....	»	5	»	15	»	3
multiples....	»	3	»	28	»	9
Cautérisations efficaces.....	1	»	»	3	»	»
— inefficaces.....	2	»	»	8	»	6
Pas de cautérisation.....	5	»	»	32	»	6
Morsures aux mem- { simples.....	»	5	»	9	»	5
bres et au tronc { multiples....	»	»	»	16	»	8
Cautérisations efficaces.....	»	»	»	3	»	»
— inefficaces.....	»	»	»	2	»	4
Pas de cautérisation.....	5	»	»	20	»	9
Habits déchirés.....	4	»	»	17	»	11
Morsures à nu.....	1	»	»	8	»	2
Morsures multiples en divers points du corps.....	»	2	»	2	»	3
Cautérisations efficaces.....	»	»	»	»	»	»
— inefficaces.....	»	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation.....	2	»	»	1	»	3
Habits déchirés.....	»	»	»	1	»	3
Morsures à nu.....	2	»	»	2	»	3
Totaux. { Français et Algériens..	15	»	71	»	27	»
Etrangers.....	1	»	4	»	3	»
	A		B		C	
TOTAL GÉNÉRAL..... 121						

4. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; La colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; La colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été :

Chiens, 113 fois; chats, 8 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.